

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THALITA BASTIDA VIEIRA

**SUSCETIBILIDADE E REVERSÃO DA RESISTÊNCIA A INSETICIDAS EM
POPULAÇÃO DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)
(Diptera: Culicidae)**

CURITIBA

2015

THALITA BASTIDA VIEIRA

**SUSCETIBILIDADE E REVERSÃO DA RESISTÊNCIA A INSETICIDAS
EM POPULAÇÃO DE *AEDES (STEGOMYIA) AEGYPTI* (LINNAEUS,
1762) (DIPTERA: CULICIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas Área de Concentração Entomologia, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da-Silva

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Vieira, Thalita Bastida

Suscetibilidade e reversão da resistência a inseticidas em população
de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)./

Thalita Bastida Vieira. – Curitiba, 2015.

97f. : il. ; 30cm.

Orientador: Mário Antônio Navarro da Silva

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Entomologia).

1. *Aedes aegypti*. 2. Diptero. 3. Resistencia a inseticidas. I. Título II.
Silva, Mário Antônio Navarro da. III. Universidade Federal do Paraná. Setor
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Entomologia).

CDD (20. ed.) 595.77

THALITA BASTIDA VIEIRA

“SUSCETIBILIDADE E REVERSÃO DA RESISTÊNCIA A INSETICIDAS EM
POPULAÇÃO DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)
(Diptera: Culicidae)”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências Biológicas”, no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva (Orientador)
(UFPR)



Profa. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis
(UFPR)



Prof. Dr. Luis Amilton Foerster
(UFPR)

Curitiba, 25 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Mário Antônio Navarro da Silva, pelo acolhimento no laboratório, pelas oportunidades oferecidas, pela confiança, pelas ajudas, ensinamentos e orientação.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia por toda a estrutura fornecida para a realização do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Entomologia pelos ensinamentos e contribuição na minha formação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

À equipe do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária: Ana Claudia Mazza Ronchi, Angela Palacio, Anyelly Marrye Luvizott, Betina Westphal Ferreira, Débora Rebechi, Gisele Moraes, Maiara Vicentini, Mario Pessoa Guedes, Monique da Luz Ferreira, Oscar Aguirre Alexander Obando e Vinicius Sobrinho Richardi. Além de alguns me ajudarem direta e ativamente no desenvolvimento do trabalho, tanto nos testes e nas análises quanto na trabalhosa criação, também foram essenciais com seus conselhos, discussões e amizade, compartilhando as experiências na vida acadêmica e na vida real. Obrigada pelas ajudas, pela boa convivência e por tornarem o ambiente de trabalho tão divertido e gostoso.

À sala 3 e agregadas: Bê, Cami, Dé, Gi, Mafer e Monique. Pelos “cafezinhos cazamigas”. Porque nos momentos de desabafos, de surtos, de raiva e de falar mal de quem merece, vocês tomam as dores, defendem e trazem o alívio. E porque no momentos de risadas, de piadas, de apoio, de carinho e de descontração, nos entendemos ainda melhor!

Aos amigos que entraram comigo no mestrado, e aos do doutorado que conheci no percurso, e compartilharam os prazeres e as dificuldades da pós-graduação.

Às amigas da faculdade, que mesmo depois de seis anos de formados continuam presentes, compartilhando o amor pela biologia e participando de todos os momentos da minha vida.

A todos os amigos e amigas de “Sanjo”, Curitiba e Rio, e ao Juninho. Por entenderem as ausências e os estresses, por darem apoio, força, incentivo e serem importantes na minha vida e, assim, essenciais na conclusão deste trabalho.

À minha família ourizonense, que está longe e faz falta e que se envolveu e aprendeu a admirar o mundo dos insetos junto comigo.

Aos meus pais Dilor e Cleidenir e à minha irmã Mariana, que são as pessoas mais importantes da minha vida! Estão sempre ao meu lado, acreditam, confiam e não desistem de mim.

Com carinho,

Thali.

RESUMO

O uso constante e intenso de inseticidas químicos para o controle do *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), vetor de importantes doenças, seleciona indivíduos resistentes a esses compostos. A resistência é sujeita à seleção natural e, conseqüentemente, a ausência dessa seleção pode ocasionar a reversão da suscetibilidade. Porém, são poucos os trabalhos relatando os mecanismos envolvidos na sua manifestação. Desta forma, o trabalho teve como objetivo avaliar a suscetibilidade e a reversão da resistência a inseticidas em população de *Aedes aegypti*. Foram utilizadas populações de *A. aegypti* coletadas em 2012 e 2013 no município de Maringá (PR), e então realizadas comparações entre as duas gerações parentais e entre as gerações F0, F5 e F10 mantidas em laboratório à partir da coleta de 2013 com ausência de contato com inseticidas. Bioensaios utilizando as concentrações resposta e diagnóstico de temefós foram realizados para calcular a CL50 e CL95 e as razões de resistência (RR50 e RR95). Para estudo dos mecanismos que conferem resistência, foi realizada a verificação da frequência da mutação Val1016Ile no gene do canal de sódio relacionado à resistência a piretróide e a quantificação de atividade das enzimas Acetilcolinesterase, Glutathione S-Transferase, Esterases (α -EST, β -EST e PNPA-EST) e Oxidase de Função Mista. Para identificar a variabilidade morfológica do tamanho e forma das asas foi utilizada a técnica de morfometria geométrica alar. Os resultados dos bioensaios com imaturos demonstraram aumento da RR95, redução da mortalidade e alteração do status de “alterado” para “resistente” de 2012 para 2013, enquanto entre as gerações mantidas em laboratório houve redução da RR95 e aumento da mortalidade, porém o status se permaneceu como “resistente”. Os ensaios moleculares mostraram que a frequência do genótipo Ile/Ile e do alelo 1016Ile foram maiores em F0 2013 quando comparados com F0 do ano anterior, e também maiores comparando-se com a geração F10, mostrando a redução da mutação *kdr* na ausência de exposição à inseticidas. Já os ensaios enzimáticos não mostraram relação entre as atividades das enzimas e a diminuição da resistência ao longo das gerações. As variações encontradas nas asas dos mosquitos através da morfometria geométrica alar evidenciaram leve separação entre os exemplares com maior grau de resistência (gerações parentais) daqueles com menor grau (gerações F5 e F10). Sendo assim, os bioensaios de suscetibilidade e ensaios moleculares foram os métodos que responderam de maneira mais satisfatória a reversão da resistência.

Palavras-chave: reversão de resistência, suscetibilidade, morfometria geométrica alar, mutação Val1016Ile, ensaio enzimático.

ABSTRACT

The constant and intensive use of chemical insecticides for control of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), which is vector of important diseases, results on the selection of individuals which are resistant to those compounds. On another hand, the absence of such selection criterion can induce to an increase of susceptibility of a population, since resistance is affected by natural selection. Despite the relevance of this subject, there are only a few studies reporting the mechanisms involved in its manifestation, which motivated this research. The present study aimed to evaluate the susceptibility and the reversal of insecticide resistance in populations of *Aedes aegypti*. Specimens collected in 2012 and 2013 in the city of Maringá (PR) were used for the performance of the following analysis: (i) comparison between parental generations (ii) comparison between generations F0, F5 and F10, which were reared in laboratory from the 2013 population, without contact with insecticides. Bioassays using multiple and diagnostic concentrations of temephos were performed to calculate the LC50 and LC95 and resistance ratios (RR50 and RR95). For the analysis of mechanisms that confer resistance, Val1016Ile mutation frequency in the sodium channel gene associated with resistance to pyrethroid was detected. The activity of enzymes acetylcholinesterase, glutathione S-transferase, esterases (EST- α , β - EST and PNPA-EST) and monooxygenases was quantified. In order to identify the morphological variability of the size and shape of the wings the alar geometric morphometry technique was applied. The bioassays with immature resulted in increase of RR95, reduction of mortality and change of the status from "altered" to "resistant" from the 2012 to the 2013 population, while among generations RR95 decreased and mortality increased, even though the status remained as "resistant". Molecular assays showed higher frequency of Ile/Ile genotype and 1016Ile allele when comparing the 2013 to the 2012 population, and even higher frequency when compared to the generation F10, while the reduction of the kdr mutation was observed in the absence of insecticides. Enzymatic tests did not indicate a link between the activities of the enzymes and the decrease in resistance over the generations. Variations detected in the wings of mosquitoes by alar geometric morphometry showed a slight segregation between the specimens with a higher degree of resistance (parental generation) and those with lower levels (F5 and F10 generations). Among the testing methods applied, the susceptibility bioassay and the molecular assay were the ones that demonstrated the resistance reversion more satisfactorily.

Keywords: reversal resistance, susceptibility, geometric morphometric of wings, Val1016Ile mutation, enzymatic assay.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Classificação dos municípios do Estado do Paraná segundo a incidência de dengue por 100.000 habitantes. Em branco, sem casos de dengue; em verde, taxa de incidência baixa (<100 casos/100.000 hab.); em amarelo, taxa de incidência média (100 a 300 casos/100.000 hab.); em vermelho, taxa de incidência alta (>300 casos/100.000 hab.). Ago/2011 a jul/2012 (a); ago/2012 a jul/2013 (b); ago/2013 a jul/2014 (c). Seta: município de Maringá. Fonte: PARANÁ (2012, 2013 e 2014).....27
- Figura 2. Mapa do estado do Paraná com destaque para a localização do Município de Maringá (em vermelho). Fonte: Modificado de PARANÁ (2010).....42
- Figura 3. Ovitrapa com palheta de madeira para oviposição de *Aedes aegypti* (a); Gaiolas de criação (b); Recipiente para oviposição no interior das gaiolas (c); Papel filtro com ovos de fêmeas de *A. aegypti* após realização do repasto sanguíneo (d).....44
- Figura 4. Interpretação dos amplificadores obtidos através da PCR alelo-específica do gene envolvido com a resistência aos piretróides. AA: Indivíduo homozigoto dominante para o alelo selvagem (Val/Val); aa: Indivíduo homozigoto recessivo para o alelo mutante (Ile/Ile); Aa: Indivíduo heterozigoto (Val/Ile); M: Marcador de peso molecular de 50 pb (Thermo Scientific).....49
- Figura 5. Asa de fêmea de *Aedes aegypti* digitalizada com a posição dos 24 marcos anatômicos (LM) utilizados.....53
- Figura 6. Representação gráfica do consenso alar obtido a partir da ligação dos marcos anatômicos.....53
- Figura 7. Frequência dos alelos selvagem (1016Val) e mutante (1016Ile) para a mutação Val1016Ile do canal de sódio voltagem-dependente nas populações de Maringá de campo (F0 2012 e F0 2013) e no decorrer das gerações F5 e F10 da população de 2013.....60
- Figura 8. Deformações dos 24 marcos anatômicos evidenciados no (a) primeiro e no (b) segundo componentes principais, escores negativo e positivo.....62
- Figura 9. Análise de variáveis canônicas referente à forma das asas de *A. aegypti* das populações estudadas.....63
- Figura 10. Deformações dos 24 marcos anatômicos evidenciados no (a) primeiro e no (b) segundo eixo canônico, escores negativo e positivo.....64

- Figura 11. Perfil de atividade enzimática e mediana de acetilcolinesterase (a), oxidase de função mista (b), glutational S-transferase (c), esterases α (d), esterase β (e) e esterase PNPA (f) de fêmeas de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller (Rock) e da geração F0 de Maringá 2012 e Maringá 2013.....68
- Figura 12. Perfil de atividade enzimática e mediana de acetilcolinesterase (a), oxidase de função mista (b), glutational S-transferase (c), esterases α (d), esterase β (e) e esterase PNPA (f) de fêmeas de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller (Rock) e das gerações F0, F5 e F10 da população de 2013 (Mgá F0, Mgá F5 e Mgá F10).....69

LISTA DE TABELAS

Tabela I.	Concentrações de temefós e etanol absoluto (99,5%) utilizadas nos bioensaios de suscetibilidade com as populações de Maringá (silvestre) e Rockefeller (suscetível). Concentrações múltiplas: C1 a C11; concentração diagnóstico: C6 (0,0162 ppm).....	46
Tabela II.	Iniciadores utilizados para a mutação Val1016Ile (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007; MARTINS; LIMA; et al., 2009).....	48
Tabela III.	Número de asas usadas nas análises morfométricas de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> de cada população.....	50
Tabela IV.	Descrição dos marcos anatômicos inseridos nos pontos de convergência e divergência das veias alares de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> , seguindo a nomenclatura morfológica segundo Forattini (1996).....	52
Tabela V.	Concentrações letais de temefós para 50% (CL50) e 90% (CL90) das larvas de <i>Aedes aegypti</i> , respectivos intervalos de confiança (95%) e razões de resistência (RR), qui-quadrado (X^2) e <i>slope</i> obtidos através de bioensaios com concentração resposta do inseticida.....	58
Tabela VI.	Status de suscetibilidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> do município de Maringá em diferentes anos e entre as gerações, baseados na concentração diagnóstico de 0,062ppm.....	59
Tabela VII.	Frequência genotípica da mutação Val1016Ile do canal de sódio voltagem-dependente nas populações de campo (F_0 de 2012 e 2013) e no decorrer das gerações F_5 e F_{10} da população de 2013. Val/Val: homozigoto dominante, Val/Ile: heterozigoto e Ile/Ile: homozigoto recessivo.....	60
Tabela VIII.	Análise estatística (ANOVA) do tamanho do centróide e da forma das asas dos indivíduos em geral. SS: soma dos quadrados; MS: média dos quadrados; df: grau de liberdade.....	61
Tabela IX.	Distância de Mahalanobis (triângulo superior) ($P < 0,0001$) e percentuais de acerto e confiabilidade na separação das populações obtida através da validação cruzada da análise discriminante (triângulo inferior).....	64
Tabela X.	Quantificação da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) e da oxidase de função mista (MFO) em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	66

Tabela XI. Quantificação da atividade enzimática de glutathione S-transferase (GST) e esterase α (α -EST) em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	67
Tabela XII. Quantificação da atividade enzimática de esterase β (β -EST) e esterase PNPA (PNPA-EST) em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	67

LISTA DE SIGLAS

α -EST	Alfa-esterase
β -EST	Beta-esterase
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChI	Acetilcolinesterase com presença de inibidor
ATC	Iodeto de acetiltiocolina
ATSDR	Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças
BSA	Albumina Sérica Bovina
C1 a C11	Concentrações de 1 a 11
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CIT	Citocromo
CL50	Concentração letal que mata 50% da população
CL90	Concentração letal que mata 90% da população
CV	Coeficiente de variação
CVA	Análise de variáveis canônicas
DD	Dose diagnóstico
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DENV	Vírus da dengue
DFA	Análise de Função Discriminante
DTNB	5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato
DR	Dose resposta
EST	Esterase
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GPA	Análise Generalizada de Procrustes
GST	Glutathiona S-transferase

HCH	Hexaclorociclohexanos
IC	Intervalo de confiança
KDR	Resistência “Knockdown”
LEMV	Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária
LM	Marcos Anatômicos
MFO	Oxidase de Função Mista
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
P450	Citocromo P450
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
PNPA-EST	PNPA-esterase
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Reação de Polimerização em Cadeira
PTN	Proteína Total
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPS	Organização Panamericana de Saúde
ROCK	Cepa referência de suscetibilidade Rockefeller
RR	Razão de resistência
RR50	Razão de resistência para CL50
RR95	Razão de resistência para CL95
UFPR	Universidade Federal do Paraná
WHO	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
<	Menor
>	Maior
®	Marca registrada
°	Graus
°C	Graus Celsius
cm	Centímetros
F0	Geração parental
F1	Primeira geração
F5	Quinta geração
F10	Décima geração
g	Gramas
h	Horas
hab/km ²	Habitantes por quilômetro quadrado
Ile	Isoleucina
km ²	Quilômetro quadrado
KOH	Hipoclorito de sódio
L	Litros
M	Molar

m	Metro
m ²	Metro quadrado
med	Mediana
min	Minutos
mg	Miligramas
mg/L	Miligramas por litro
ml	Mililitros
n	Número de indivíduos
Na _v	Canal de sódio voltagem dependente
nm	Nanômetro
p99	Percentil 99
ppm	Partes por milhão (µg.L ⁻¹)
SD	Desvio Padrão
Val	Valina
X	Média
χ ²	Qui-quadrado
µg	Microgramas
µl	Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	21
3.1.1 Febre Amarela Urbana	22
3.1.2 Chikungunya	23
3.1.3 Dengue.....	24
3.2 Controle do Vetor	27
3.2.1 Controle Químico.....	28
3.3 Resistência aos Inseticidas	32
3.3.1 Resistência Metabólica.....	33
3.3.2 Resistência por Alteração do Sítio-Alvo.....	37
3.4 Reversão da Resistência aos Inseticidas	40
3.5 Morfometria Geométrica Alar	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Área de Estudo.....	41
4.2 Material Biológico.....	43
4.2.1 População de Maringá.....	43
4.2.2 Colônia Rockefeller	44
4.3 Bioensaios de Suscetibilidade	44
4.3.1 Bioensaio Dose Resposta ou Concentrações Múltiplas.....	45
4.3.2 Bioensaio Dose Diagnóstico	46
4.4 Ensaios Moleculares	47
4.4.1 Extração de DNA.....	47
4.4.2 PCR alelo-específica.....	48
4.4.3 Gel de Poliacrilamida	49

4.4.4 Análises Estatísticas	49
4.5 Morfometria Geométrica Alar	50
4.5.1 Preparação das asas	50
4.5.2 Coleta e Análise dos Dados.....	50
4.6 Ensaios Bioquímicos	54
4.6.1 Preparação do material	54
4.6.2 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)	55
4.6.3 Atividade da Oxidase de Função Mista.....	55
4.6.4 Atividades das Esterases Alfa (α -EST) e Beta (β -EST)	56
4.6.5 Atividade da Esterase PNPA	56
4.6.6 Atividade da Glutathione S-Transferase (GST)	56
4.6.7 Quantificação de Proteína total (PTN)	57
4.6.8 Análises.....	57
5 RESULTADOS	58
5.1 Bioensaios de Suscetibilidade	58
5.1.1 Bioensaio Dose Resposta.....	58
5.1.2 Bioensaio Dose Diagnóstico.....	58
5.2 Ensaios Moleculares	59
5.2.1 Frequência Genotípica	59
5.2.2 Frequência Alélica	60
5.3 Morfometria Geométrica Alar	61
5.4 Ensaios Bioquímicos	65
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÃO	79

1 INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é um importante vetor de agentes etiológicos no mundo, como dengue, chikungunya e febre amarela urbana (POWELL; TABACHNICK, 2013). O crescimento urbano sem planejamento e a ausência de serviço de saneamento básico adequado favorecem a manutenção dos criadouros e a proliferação deste vetor (BRASIL, 2014a). Os esforços para a erradicação da doença estão voltados ao controle do vetor, já que não há vacinas ou drogas licenciadas disponíveis contra a dengue. A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2012) indica que sejam usados diversos métodos em conjunto para o controle eficaz do mosquito, porém os mais amplamente utilizados são os inseticidas químicos.

O uso contínuo de inseticidas em áreas com elevado número de casos de dengue durante os últimos anos pode selecionar os indivíduos de *A. aegypti* resistentes a inseticidas, prejudicando as ações de controle do vetor (BESERRA et al., 2007; BISSET; RODRÍGUEZ, 2007; PERRY et al., 2011). A resistência a inseticidas é hereditária e, portanto, sujeita à seleção natural (LABBÉ et al., 2007) e reflete em uma menor vantagem biológica dos indivíduos resistentes na seleção pelo inseticida. O custo na eficácia biológica tem importantes implicações para a persistência da resistência e para a reversão na suscetibilidade em populações de campo (BERTICAT et al., 2002; MONTELLA et al., 2007).

Diante do conceito de que a pressão de seleção influencia os níveis de resistência que uma população apresenta (PERRY et al., 2011), acredita-se então, que submetendo os indivíduos à ausência de pressão de seleção, possa ser então verificada a reversão da resistência.

Diversas técnicas são utilizadas para avaliar a resistência, como por exemplo, bioensaios com imaturos, utilizados para verificar a suscetibilidade do mosquito a inseticida organofosforado (BROGDON; MCALLISTER, 1998); análises moleculares, realizadas para detecção da presença de mutação no sítio alvo do inseticida (HEMINGWAY et al., 2004); análises bioquímicas, úteis para verificar as alterações nas atividades das enzimas metabólicas do inseto (VALLE et al., 2006); morfometria geométrica alar, que fornece respostas

quanto à variação de forma e tamanho das asas intra e interpopulacionais (DHIVYA; MANIMEGALAI, 2013).

Para detectar possíveis mecanismos de resistência e sua reversibilidade, a utilização de diversos parâmetros comparativos pode fornecer maior robustez aos testes de hipótese em caracterização populacional, maiores chances de se detectar as variações fenotípicas e genotípicas referentes à resistência e levantar informações importantes para a adoção de medidas mais eficazes no controle do vetor (LIU, 2012; ZAMBRANO, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a suscetibilidade e a reversão da resistência a inseticidas em população de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae).

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a evolução da suscetibilidade ao larvicida temefós em população de campo e de laboratório de *Aedes aegypti*;
- Verificar a frequência da mutação Val1016Ile no gene do canal de sódio de *A. aegypti*, em população de campo e entre as gerações criadas em laboratório;
- Quantificar a atividade enzimática de Acetilcolinesterase, Oxidase de Função Mista, Esterases e Glutathione S-Transferase em população de campo e de laboratório de *A. aegypti*;
- Analisar a variabilidade morfológica das asas em população de campo e de laboratório de *A. aegypti*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) pertence à família Culicidae, ordem Diptera (FORATTINI, 2002). Em 2004, o subgênero *Stegomyia* foi elevado a gênero e a espécie *Aedes (Stegomyia) aegypti* passou a ser nomeada *Stegomyia (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (REINERT et al., 2004). Porém, devido à grande importância na saúde pública e o amplo conhecimento da população mundial, o presente trabalho adotou a nomenclatura antiga para referir-se à espécie.

O mosquito *A. aegypti* teve origem na África (BELKIN, 1962) e chegou à região neotropical devido a navios que partiam deste continente com destino às Américas. Sua distribuição é quase cosmopolita, com destaque pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo (FORATTINI, 2002; WHO, 2013).

No Brasil, foi considerado erradicado em 1955 e 1973 e reintroduzido em 1967 e 1976 e desde então, distribuiu-se para os 26 estados e Distrito Federal (VALOTTO et al., 2010).

Beserra et al. (2006) em estudo sobre a biologia de *A. aegypti*, concluíram que a temperatura favorável ao desenvolvimento do vetor encontra-se entre 21°C e 29°C, e para a longevidade e fecundidade dos adultos, a temperatura ideal é entre 22°C e 30°C. A 26°C, o tempo médio de desenvolvimento para as fases de ovo, larva (com quatro ínstares larvais) e pupa são de 4,34 dias, 8,24 dias e 2,36 dias, respectivamente. De acordo com Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994), os três estágios iniciais ocorrem obrigatoriamente em meio aquático e o estágio adulto ocorre em ambiente terrestre. O *A. aegypti* vive em média 30 dias na fase adulta e ambos os sexos alimentam-se de seiva vegetal. No entanto, as fêmeas necessitam das proteínas presentes no sangue de hospedeiros vertebrados para que ocorra a maturação dos ovos (repasto sanguíneo).

O mosquito é conhecido pela sua eficiente capacidade vetorial com uma elevada afinidade para o sangue humano, alta suscetibilidade aos sorotipos do vírus da dengue, altamente adaptados à vida urbana (WHO, 2011), sendo a transmissão predominantemente domiciliar (FORATTINI, 2002). Prefere

reproduzir-se em reservatórios de água limpa, no entanto adaptaram-se a locais ricos em matéria orgânica (VAREJÃO et al., 2005).

As ações destinadas ao seu controle e os novos habitats disponíveis mostram a grande capacidade de adaptação, grande variabilidade genética e, conseqüentemente, elevados valores de heterozigose que esta espécie apresenta. A heterozigose pode ser justificada pelas introduções sucessivas da espécie na região neotropical e pode ser a razão pela qual sua erradicação é difícil de ser realizada (FORATTINI, 2002).

A. aegypti é vetor de importantes doenças que atingem os seres humanos, como a dengue, a febre amarela urbana e chikungunya, que podem causar severas morbidade e mortalidade (POWELL; TABACHNICK, 2013).

Outras espécies do gênero *Aedes* também apresentam a capacidade de transportar os vírus das doenças mencionadas (GUBLER, 1998), como *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894), sendo este o vetor de importância secundária. A nomenclatura recente para a espécie é *Stegomyia albopicta* (Skuse, 1895), subgênero incerto (HARBACH, 2014). A espécie é de origem asiática (FORATTINI, 2002) e o comércio de pneus tem sido o responsável pela dispersão do mosquito para novas áreas nas últimas três décadas (LOUNIBOS, 2002). Foi encontrado como vetor principal de dengue e chikungunya em algumas regiões do globo, como no Oceano Índico (RAHARIMALALA et al., 2012) e Ilha da Reunião (VAZEILLE et al., 2009) em 2006, na Itália em 2007 (BONILAU et al., 2008).

3.1.1 Febre Amarela Urbana

A febre amarela é uma doença infecciosa causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus* e se mantém endêmica nas florestas tropicais da América e África (VASCONCELOS et al., 2003).

Epidemiologicamente, a febre amarela é dividida em rural e urbana, que diferem entre si quanto à natureza dos transmissores, dos hospedeiros vertebrados e o local de ocorrência. Sob o ponto de vista etiológico, clínico, imunológico e fisiopatológico, a doença é a mesma. O ciclo urbano é transmitido pelo *A. aegypti* e o ciclo silvestre é mais complexo e a transmissão envolve primatas não humanos e mosquitos diurnos, principalmente dos

gêneros *Sabethes* e *Haemagogus* na América Latina (VASCONCELOS et al., 2003; TAUIL, 2010).

De acordo com Tauil (2010) existe vacina preventiva contra a doença, bastante eficaz e segura, cujo efeito inicia-se no décimo dia após a vacinação e permanece por pelo menos dez anos.

Estimam-se em 200.000 casos de febre amarela por ano em todo o mundo, com 30.000 mortes (WHO, 2014). No Brasil, a febre amarela tem caráter sazonal, ocorrendo entre os meses de dezembro a maio, quando temperatura e precipitação pluviométrica propiciam o aumento da abundância dos vetores (VASCONCELOS, 2010). A doença ocorre esporadicamente, com registros de casos humanos isolados nas áreas consideradas endêmicas (região amazônica), assim como na forma de surtos de maior ou menor magnitude, quando ocorre fora da área endêmica. Durante o período de julho de 2012 a julho de 2013, foram registrados 282 casos humanos suspeitos e apenas dois casos confirmados no Amazonas (BRASIL, 2014b).

3.1.2 Chikungunya

O vírus da chikungunya é um arbovírus do gênero *Alphavirus*, pertencente à família *Togaviridae*, transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* (REITER et al., 2006). O vírus é originário da África e vem se espalhando por diversas regiões do globo. Os surtos ocorreram em países da África, Ásia, Europa, e dos oceanos Índico e Pacífico. No final de 2013, o vírus chikungunya foi encontrado pela primeira vez nas Américas nas ilhas do Caribe e atualmente a transmissão foi identificada em 41 países (BRASIL, 2014a).

Em 2014, até o mês de novembro, foram confirmados 1.425 casos autóctones de febre de chikungunya no Brasil e 71 casos importados, identificados nos estados: Amazonas, Amapá, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Roraima e São Paulo (BRASIL, 2014a).

Os sintomas mais comuns da infecção por vírus chikungunya são febre e dor nas articulações. Outros sintomas podem incluir dor de cabeça, dor muscular, inchaço das articulações, ou erupção cutânea; Não existe vacina

para prevenir ou medicamento para tratar a infecção pelo vírus chikungunya (CDC, 2014).

3.1.3 Dengue

A dengue é um importante problema de saúde pública no mundo cuja ocorrência está intimamente relacionada com a distribuição de seus vetores (PERRY et al., 2011). Apesar do conhecimento acumulado e dos diversos estudos realizados há mais de dois séculos, continua sendo uma das prioridades da Saúde Pública (PERIAGO; GUZMÁN, 2007).

A enfermidade é transmitida através da picada da fêmea de mosquitos do gênero *Aedes* Meigen, 1818 (TEIXEIRA et al., 1999). É causada por um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* e existem quatro variações: os sorotipos 1 (DENV-1), 2 (DENV-2), 3 (DENV-3) e 4 (DENV-4) (WHO, 2014). A imunidade é sorotipo-específica, ou seja, a infecção com um determinado sorotipo confere imunidade permanente contra o mesmo e por alguns meses contra todos os sorotipos. De acordo com Real et al. (2013), os quatro sorotipos da dengue são infectantes para o ser humano, possuem diferentes representações clínicas, desde febre a formas graves de choque e hemorragias letais e a maioria manifesta-se na forma subclínica ou assintomática. Manifestações incomuns, como miocardiopatia, insuficiência hepática e distúrbios neurológicos também foram relatados.

A dengue do tipo 4 apresenta risco a pessoas já contaminadas com os vírus 1, 2 e 3, que são vulneráveis à manifestação alternativa da doença. A presença do DENV-4 aumenta a possibilidade de uma pessoa ser infectada novamente, evoluindo para a dengue hemorrágica, a forma mais grave da doença (PARANÁ, 2013a). Recentemente, foi descoberto por pesquisadores da Universidade do Texas o sorotipo 5 da dengue, porém não há confirmação de sua capacidade infectiva em humanos. A circulação até então foi relatada entre macacos na Malásia. Se confirmado em humanos, os esforços de controle da dengue e especialmente a busca por uma vacina que proteja contra todos os tipos ao mesmo tempo ficará mais complexa (NORMILE, 2013).

Há décadas, esforços têm sido direcionados à produção da vacina contra a dengue. Em novembro de 2014, Villar e colaboradores chegaram à última

fase de desenvolvimento da vacina, mostrando que a imunização tem eficácia de 60,8% contra os quatro sorotipos da doença. Porém, a taxa de sucesso ainda desperta dúvidas quando comparada à eficácia de outras vacinas (THOMAS, 2014), sendo assim, o controle do vetor ainda é a principal estratégia preventiva.

Há relatos da doença no mundo desde meados do século XVII, porém os primeiros registros mais plausíveis datam de 1779/1780, na Ásia, África e América do Norte. Por muitos anos a pandemia da doença ficou restrita a países do Sudeste da Ásia e do Pacífico Ocidental (GUBLER; CLARK, 1995; GUBLER, 1998). Porém, a incidência da dengue tem crescido dramaticamente em áreas endêmicas das regiões tropicais e subtropicais do mundo nas últimas décadas, juntamente com a expansão geográfica para novos países e da região urbana para rural (WHO, 2009). Estudos recentes estimam que ocorram de 50 a 100 milhões de casos de infecções de dengue no mundo anualmente, com 500 mil casos de febre hemorrágica da dengue e pelo menos 12 mil mortes, principalmente entre as crianças. Globalmente, 2,5 bilhões de pessoas vivem atualmente em mais de 100 países ou territórios em que o vírus da dengue pode ser transmitido (WHO, 2014).

De acordo com uma revisão realizada por Dick et al. (2012) sobre a história dos surtos de dengue nas Américas, a primeira suspeita de epidemia foi reportada em 1635 em Martinica e Guadalupe e 1699 no Panamá. No início do século XX, uma distribuição ampla da doença foi observada, dos Estados Unidos a Chile e Argentina e a cada ano foram sendo registrados casos em diferentes locais das Américas. O ano de 2013 foi um dos piores anos para história da dengue nas Américas com 2,3 milhões de casos, incluindo 37.705 casos graves e 1.289 mortes (OPS, 2014).

Apesar dos esforços dos países para controlar a doença, a dengue continua se espalhando graças a: urbanização não planejada, aumento do tráfego internacional de passageiros, falta de serviços básicos nas comunidades, pobre gestão ambiental (SAN MARTÍN et al., 2010; OPS, 2014) e a mudança climática global, que tem impacto sobre a reprodução do vetor e aumenta o risco de transmissão de doenças (DE et al., 2014).

A primeira ocorrência da dengue no Brasil data de 1845 no Rio de Janeiro e foi considerada erradicada até a reintrodução do *A. aegypti* no país, em 1967

(PARANÁ, 2013a). A circulação só foi comprovada laboratorialmente em 1982, quando os sorotipos DENV-1 e DENV-4 foram isolados em Roraima ficando o país sem notificação de casos por quatro anos (IOC, 2014). A partir de 1986 irrompeu a epidemia de dengue no Estado do Rio de Janeiro e a circulação do sorotipo 1, que logo alcançou a Região Nordeste. Dessa forma, associadas à introdução de novos sorotipos em áreas anteriormente indenes, a dengue se tornou endêmica no Brasil (SILVA-JUNIOR et al., 2002).

No Brasil já foram encontradas variações da dengue tipo 1, 2, 3 e 4. O vírus tipo 4 (DENV-4) não era registrado no país há 28 anos, mas em 2010 foi notificado nos estados de Amazonas e Roraima. O ministério da saúde alerta que grande parte da população brasileira não tem imunidade contra o DENV-4, e caso ocorra dispersão para outros estados, o risco de epidemia é maior (PARANÁ, 2013a).

Para a reemergência de epidemias de dengue clássica e a emergência da febre hemorrágica de dengue, houve contribuição das mudanças demográficas, intensa migração, crescimento desordenado das cidades e más condições de saneamento básico, permitindo a proliferação do *A. aegypti* (BRASIL, 2002; BRAGA; VALLE, 2007a).

A dengue apresenta um padrão sazonal no país, com maior incidência de casos nos primeiros cinco meses do ano, período mais quente e úmido, típico dos climas tropicais (RIBEIRO et al., 2006).

O Estado do Paraná apresenta grande incidência da doença. Durante o período de agosto de 2011 a julho de 2012 (Figura 1a) foram notificados 2.400 casos de dengue no estado (PARANÁ, 2012). No mesmo período no ano seguinte (Figura 1b), foram confirmados 52.054 casos e a taxa de incidência foi alta, com 492,62 casos por 100 mil habitantes (PARANÁ, 2013b).

No período de agosto de 2013 a julho de 2014 foram notificados 57.075 casos de suspeita de dengue, com 19.384 casos confirmados (Figura 1c). A incidência no estado foi de 170,41 casos por 100 mil habitantes, considerada média. O município de Maringá foi o que apresentou maior número de casos confirmados (3.683) no Estado em 2014 (PARANÁ, 2014).

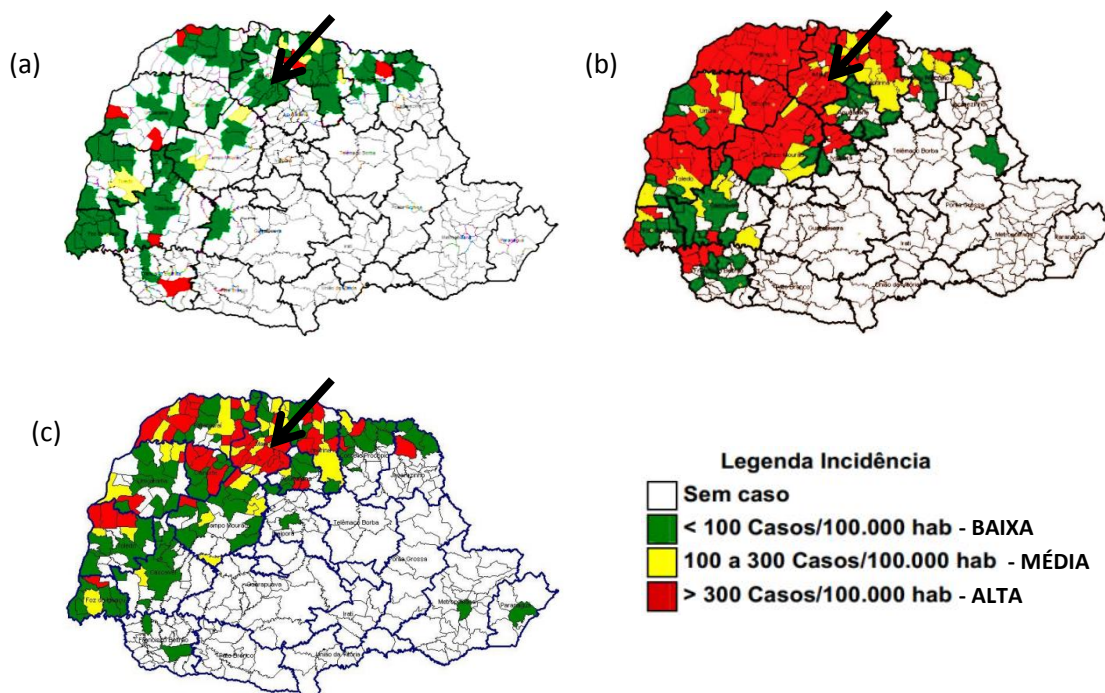


Figura 1. Classificação dos municípios do Estado do Paraná segundo a incidência de dengue por 100.000 habitantes. Em branco, sem casos de dengue; em verde, taxa de incidência baixa (<100 casos/100.000 hab.); em amarelo, taxa de incidência média (100 a 300 casos/100.000 hab.); em vermelho, taxa de incidência alta (>300 casos/100.000 hab.). Ago/2011 a jul/2012 (a); ago/2012 a jul/2013 (b); ago/2013 a jul/2014 (c). Seta: município de Maringá. Fonte: PARANÁ (2012, 2013 e 2014).

3.2 Controle do Vetor

As primeiras práticas para o controle de insetos datam de mais de 2.000 anos, na China, e eram relacionadas ao controle biológico de pragas agrícolas. Ao final do século XIX, percebeu-se que importantes doenças eram transmitidas por insetos e outros artrópodes e, como vacinas e drogas não eram sempre disponíveis para prevenção ou tratamento das doenças, controlar o vetor era a principal forma de controlar as doenças. Os primeiros programas de controle constituíam nas medidas físicas de proteção das casas através do uso de mosquiteiros, drenagem ou enchimento de pântanos, bem como aplicação de óleo nos criadouros (BRAGA; VALLE, 2007b).

Em controle de vetores, a implementação de somente uma estratégia não garante a remoção permanente do problema, sendo mais indicado envolver a combinação de diferentes alternativas e contar com os recursos disponíveis que se adequem à realidade local (ZAMBRANO, 2014). Além disso, as

medidas devem ser complementadas com informações entomológicas, sobre o hospedeiro humano, a dinâmica de transmissão da doença e variáveis socioeconômicas e ambientais. Estes fatores são as bases para o manejo integrado de vetores (OPS, 2013). O envolvimento eficaz da comunidade na realização das medidas de controle é essencial, permitindo que o controle no ambiente doméstico e ações de gestão ambiental são alcançados cada vez que a população identificar os fatores de risco (ZAMBRANO, 2014).

O controle das populações de mosquitos pode ser de três tipos principais: o controle mecânico, mais eficiente e menos impactante para o meio ambiente, pois visa a vigilância e o manejo ambiental através da eliminação do vetor, seus focos e criadouros artificiais; o controle biológico, com o uso de predadores, parasitas e organismos patogênicos para o controle populacional; e o controle químico, usado quando os demais não são eficazes, utilizando-se de repelentes e inseticidas para o controle das formas larvais (larvicidas) e adultas (adulticidas) (BRAGA; VALLE, 2007b; OPS, 2013).

3.2.1 Controle Químico

A descoberta dos inseticidas foi um grande avanço no controle de insetos vetores de doenças e ainda hoje são os principais recursos para o controle de insetos pragas de agricultura e vetores de enfermidades (PERRY et al., 2011).

Ao longo dos anos, muitos inseticidas foram desenvolvidos, porém a OMS recomenda a utilização de quatro classes principais: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. De forma geral, estes compostos atuam sobre o sistema nervoso central dos insetos, levando-os à morte (BRAGA; VALLE, 2007b).

3.2.1.1 Organoclorados

O primeiro inseticida de efeito prolongado descoberto foi o organoclorado DDT (diclorodifeniltricloroetano). Sintetizado em 1874, suas propriedades inseticidas contra vários tipos de artrópodes só foram descobertas em 1939 pelo químico suíço Paul Hermann Müller, tendo sido largamente usado após a Segunda Guerra Mundial para o combate aos mosquitos vetores da malária e

do tifo. O DDT não ocorre naturalmente no meio ambiente e adere fortemente ao solo, ficando sobre sua camada superficial potencialmente por dezenas de anos (ATSDR, 2002). Sabe-se que ele atua no canal de sódio, mantendo-o aberto e destruindo o equilíbrio de íons sódio e potássio dos axônios, impedindo a transmissão normal de impulsos nervosos em insetos e mamíferos (BRAGA; VALLE, 2007b).

Seu efeito é inversamente proporcional à temperatura, ou seja, quanto mais baixa a temperatura, mais tóxico é o DDT para os insetos. Estudos revelaram que nas áreas tropicais, o tempo de ação do DDT é mais curto quando comparado às áreas temperadas, em que o produto químico evapora com maior rapidez, podendo desaparecer em um ano. Em regiões temperadas, metade do DDT inicialmente presente geralmente desaparece em cerca de cinco anos. No entanto, em alguns casos pode permanecer durante 20 ou mais anos (ATSDR, 2002).

Os organoclorados tiveram seu uso descontinuado e foram proibidos praticamente no mundo todo, com exceção da África. Nos Estados Unidos foi proibido em 1972, pois durante sua produção e uso como inseticida foi verificada contaminação do ar, da água e do solo, e houve acúmulo nos tecidos do organismo de animais e de humanos, provocando inúmeras doenças (ATSDR, 2002). No Brasil, a fabricação, a comercialização e o uso do DDT estão proibidos desde 2009 (BRASIL, 2009).

Além do grupo difenil-alifático, do qual faz parte o DDT, existem também outros grupos de organoclorados, como os hexaclorociclohexanos (HCH), que age de forma parecida ao difenil-alifático; os ciclodienos, que, ao contrário dos demais organoclorados mencionados, possuem uma correlação positiva entre temperatura e toxicidade e agem impedindo a entrada dos íons cloreto nos neurônios, antagonizando os efeitos do receptor de GABA (ácido gama-aminobutírico); e os policloroterpenos, com ação semelhante aos ciclodienos, que foram usados principalmente na agricultura (BRAGA; VALLE, 2007b).

3.2.1.2 Organofosforados

Os organofosforados surgiram logo após os organoclorados e incluem todos os inseticidas que contêm fósforo. São lipossolúveis, o que facilita sua

penetração nos organismos e agem inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE), fazendo com que a acetilcolina (ACh) não seja degradada em seus produtos (colina e ácido acético) e acumule na fenda sináptica. Isso proporciona um maior tempo de permanência do neurotransmissor no seu receptor colinérgico e constante propagação do impulso nervoso, levando à hiperexcitação e morte (DOMINGUES et al., 2010).

São classificados de acordo com sua natureza química em três categorias: alifáticos (malation, vapon, vidrin), aromáticos (etil e metil paration, fenitrothion, temefós, etc.) e heterocíclicos (clorpirifos, clorpirifos-metil, etc.) (WARE; WHITACRE, 2004).

São amplamente utilizados em Saúde Pública por apresentarem vantagens sobre os organoclorados, como a não acumulação nos tecidos e a biodegradação. Porém, são mais tóxicos para os vertebrados e quimicamente instáveis, o que faz com que sua aplicação tenha que ser renovada periodicamente (BRAGA; VALLE, 2007a). Temefós e malation são comumente empregados em programas de controle de vetores de patógenos, como o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) (BRAGA; VALLE, 2007a; CASTRO et al., 2007; MAESTRE et al., 2009).

O temefós ($C_{16}H_{20}O_6P_2S_3$) foi registrado nos Estados Unidos em 1965 e utilizado na agricultura e no controle de vetores de agentes etiológicos em várias partes do mundo. É o único desta classe a ser utilizado no controle de larvas recomendado pela Organização Mundial da Saúde para uso em água potável e tem sido utilizado como inseticida no Brasil desde aproximadamente 1980 para o controle do *A. aegypti* (FISPQ, 2010; WHO, 2008). Devido à sua instabilidade química, requer aplicações periódicas, em ciclos bimestrais (MÉLO et al., 2008). Por outro lado, o temefós pode causar intoxicações graves quando absorvido pelos pulmões ou ingerido em altas doses, sendo ainda discretamente irritante em contato com a pele e com os olhos (FISPQ, 2010; WHO, 2008).

3.2.1.3 Carbamatos

Os carbamatos são inseticidas derivados do ácido carbâmico e sua comercialização teve início por volta dos anos 1960. No país, o seu uso na

agricultura aumentou em 1985 após a proibição dos organoclorados em todo território nacional (PARREIRA et al., 2001). Fazem parte dessa classe os inseticidas carbaril, carbofuran e propoxur. Possuem atividade inseticida muito eficiente e seu mecanismo de ação é semelhante aos organofosforados, inibindo a enzima acetilcolinesterase. A principal diferença entre as duas classes de compostos é que a inibição pelos carbamatos é reversível (BRAGA; VALLE, 2007b).

O mecanismo de inibição da acetilcolinesterase por carbamatos ocorre por meio da formação de um complexo enzima-inibidor e posterior carbamilação (MAXWELL et al., 2008).

3.2.1.4 Piretróides

Os piretróides são compostos naturais e sintéticos que apresentam estruturas semelhantes à piretrina, componente ativo extraído das flores do *Chrysanthemum (Pyrethrum) cinerariaefolium* (CASIDA; QUISTAD, 1995). São biodegradáveis, não cumulativos, atuam em pequenas doses, de baixo custo e raramente provocam intoxicações agudas em aves e mamíferos, porém são extremamente tóxicos aos animais aquáticos. Apresentam baixa toxicidade nos humanos e são neurotóxicos aos insetos (BRAGA; VALLE, 2007b).

Os piretróides atuam de forma semelhante aos organoclorados, mantendo os canais de sódio da membrana dos neurônios abertos, porém seu efeito estimulante é mais pronunciado. Mosquitos tratados com piretróides apresentam um quadro de hiperexcitabilidade, descoordenação e paralisia. A ação letal dos piretróides provavelmente envolve neurônios periféricos e centrais, enquanto o efeito *knockdown* é produzido por intoxicação periférica (HEMINGWAY et al., 2004). Podem ter um coeficiente de temperatura negativo, como acontece com o DDT, ou positivo, no qual a mortalidade dos insetos é diretamente proporcional ao aumento da temperatura (BRAGA; VALLE, 2007b).

Segundo Lima et al. (2003), no Brasil, os piretróides são utilizados desde 2000 como uma alternativa ao uso dos organofosforados. A resistência a eles foi detectada pela primeira vez poucos anos após o início de sua utilização no combate aos adultos de *A. aegypti*.

Os piretróides são os inseticidas mais utilizados para o controle de mosquitos em períodos de altos níveis de infestação ou em casos de surtos epidêmicos (RODRÍGUEZ et al., 2014), praticamente substituindo o uso das outras três classes de inseticidas (HEMINGWAY et al., 2004).

Fazem parte desta classe os inseticidas deltametrina, permetrina, cipermetrina, cialotrina, entre outros (KAWADA et al., 2014).

3.3 Resistência aos Inseticidas

O uso prolongado de inseticidas tem selecionado populações resistentes em diversas partes do mundo (WHO, 1992).

Com o uso intenso do DDT em campanhas de erradicação da dengue, malária, febre amarela e pediculose apareceram os primeiros registros de insetos resistentes ao inseticida. Os primeiros trabalhos descrevendo a resistência datam de aproximadamente 1950 (BUSVINE, 1951).

No Brasil, a primeira indicação de resistência ao temefós data de 1991, em São Paulo. Em 1996 se iniciou o primeiro programa estadual de monitoramento da resistência, e se estendeu para todos os estados brasileiros em 1999 (MACORIS et al., 2005).

Desde o primeiro relato de resistência dos mosquitos aos inseticidas, as pesquisas com o objetivo de compreender o desenvolvimento de resistência a inseticidas em mosquitos tem sido intensa, com mais de 1.500 trabalhos de pesquisa originais e revisões publicados em revistas científicas (LIU, 2015).

De acordo com a OMS, resistência é definida como a habilidade que uma população de insetos possui de tolerar uma dose de inseticida que, em condições normais, seria letal para as demais populações. A resistência vem evoluindo devido à forte pressão de seleção imposta pelo uso generalizado de inseticidas, sendo este um dos principais problemas para o combate do vetor, pois pode influenciar importantes processos biológicos (PERRY et al., 2011).

Resistência a inseticidas é o resultado de mutação que pode afetar características fisiológicas ou comportamentais do inseto (MONTELLA et al., 2007), ou seja, é um fenômeno genético, no qual o inseticida seleciona aqueles indivíduos que sobrevivem à sua exposição (FFRENCH-CONSTANT et al., 2004).

No geral, os mecanismos envolvidos na resistência aos inseticidas são: diminuição da taxa de penetração do composto pela cutícula; detoxificação ou metabolização do inseticida por enzimas; diminuição da sensibilidade do sítio de ação do inseticida pelo sistema nervoso; e comportamental (HEMINGWAY, 2000; BECKEL et al., 2004).

O mecanismo de resistência ligado à redução na penetração do inseticida caracteriza-se pelo espessamento ou pela mudança na composição química da cutícula do inseto. Confere pouca resistência, mas é importante quando associado com outros mecanismos (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998). A resistência comportamental é verificada pela repelência, no qual os insetos evitam o contato com locais que contenham a substância tóxica (HEMINGWAY, 2000; BECKEL et al., 2004).

3.3.1 Resistência Metabólica

O incremento do metabolismo pode ser resultado de: a) Mudança estrutural da enzima, em que ocorre substituição na região codificante do gene, podendo acarretar em um aumento na atividade da enzima detoxificadora ou em sua afinidade pelo substrato, tornando-a mais eficaz na degradação do inseticida; b) Amplificação gênica, em que há um aumento no número de cópias do gene que codifica a enzima envolvida no processo, aumentando a quantidade de enzima produzida (ocorre nas esterases); c) Expressão gênica alterada, que também acarreta em mudança na quantidade de enzima, decorre de uma mutação na região promotora do gene, fazendo com que este seja mais expresso no inseto resistente (ocorre em GST e MFO) (HEMINGWAY et al., 2004; LI et al., 2007; MONTELLA et al., 2012).

Ao entrar em contato com um organismo, os xenobióticos, sejam eles inseticidas ou não, podem desencadear reações de biotransformação, catalisadas por um sistema multienzimático, em que ocorre a transformação enzimática do inseticida em outra substância por meio de alterações bioquímicas, ocasionando a resistência metabólica (FROVA, 2006; BRAGA; VALLE, 2007b).

Esse processo pode ocorrer em três fases. A detoxificação que contribui para a resistência é realizada por enzimas de Fase I (oxidases de função mista

e esterases) ou de Fase II (glutathione S-transferase). As enzimas de Fase I reconhecem e atuam diretamente sobre o composto exógeno, levando à modificação química da molécula. Quando não excretados, os produtos resultantes podem sofrer reação de conjugação pelas enzimas de Fase II, tornando a molécula solúvel. Na Fase III ocorre a compartimentalização e/ou excreção dos metabólitos não-tóxicos gerados (HEMINGWAY et al., 2004; FROVA, 2006; BRAGA; VALLE, 2007b). Todas essas enzimas agem de maneira integrada, podendo diminuir a quantidade e o tempo de permanência do xenobióticos no organismo do inseto e levando ao aumento da atividade das enzimas detoxificadoras (SHEEHAN et al., 2001).

Os mecanismos de resistência metabólica são conhecidos por causar resistência cruzada entre as classes de inseticidas e com outros produtos químicos utilizados para o controle de insetos (MONTELLA et al., 2012).

A resistência metabólica verificada através de ensaios bioquímicos foram descritas em diversos trabalhos com *A. aegypti* (MONTELLA et al., 2007; POUPARDIN et al., 2008; WAN-NORAFIKAH et al., 2010; LIMA et al., 2011; POLSON et al., 2011; FONSECA-GONZÁLEZ et al., 2011; MCALLISTER et al., 2012; STRODE et al., 2012; BRITO et al., 2013; ZAVALA et al., 2014; RODRÍGUEZ et al., 2014; MAESTRE-SERRANO et al., 2014) e outras espécies da família Culicidae, como *Aedes albopictus* (MCALLISTER et al., 2012; DAS; DUTTA, 2014), *Anopheles funestus* (CASIMIRO et al., 2007; BROOKE et al., 2007; OKOYE et al., 2008; MORGAN et al., 2010; DJOUAKA et al., 2011), *Culex quinquefasciatus* (SARKAR et al., 2009; TAHIR et al., 2013; WAN-NORAFIKAH et al., 2013; AMORIM et al., 2013), etc.

As três principais enzimas ou família de enzimas envolvidas no mecanismo de resistência metabólica são as esterases, as glutathione-S-transferases e as oxidases (BASS; FIELD, 2011).

3.3.1.1 Esterases

As esterases estão presentes em todos os organismos vivos. Nos insetos, desempenham uma série de funções cruciais no desenvolvimento e no comportamento, como a degradação odorante, funções relacionadas à reprodução, à digestão, ao metabolismo hormonal, entre outros. Muitas

moléculas importantes, tais como feromônios e outros semioquímicos, são tipos de ésteres que são hidrolisados por esterases que pertencem principalmente à família de genes carboxilesterase (MONTELLA et al., 2012).

As ESTs possuem grande importância, pois estão relacionadas à resistência aos principais produtos químicos usados extensivamente por programas vetoriais e de controle de pragas. Estão envolvidas especificamente na detoxificação de organofosforados, porém também são frequentemente envolvidas na resistência a carbamatos e a piretróides (NAUEN, 2007; LI et al., 2007; MONTELLA et al., 2012).

A maioria das esterases pertence ao grupo das carboxilesterases, uma família de genes dentro da superfamília de alfa/beta hidrolase, encontrada em diversas enzimas funcionalmente diferentes que são capazes de hidrolisar substratos com características químicas diferentes. Por exemplo, esta superfamília inclui as proteases, lipases, esterases, dehalogenases, peroxidases e epóxido hidrolases, entre outras (MONTELLA et al., 2012).

A atividade das alfa-esterases, beta-esterases e PNPA-esterases podem ser medidas pela capacidade que essas enzimas têm de hidrolisar os substratos α -naftil acetato, β -naftil acetato e P-nitrofenil acetato, respectivamente, sendo essa uma forma de classificação das esterases dos mosquitos (MONTELLA et al., 2007). As demais classificações são baseadas na mobilidade das enzimas no gel de poliacrilamida e em sua sequência de nucleotídeos (HEMINGWAY; RANSON, 2000).

Esterases de insetos suscetíveis são significativamente menos reativas com xenobióticos do que os seus homólogos em insetos resistentes (HEMINGWAY et al., 2004).

3.3.1.2 Glutathione-S-Transferase

As GSTs constituem uma família de isoenzimas multifuncionais fundamentais na detoxificação celular de um grande número de compostos endógenos e exógenos. Elas promovem resistência a organofosforados, organoclorados e piretróides por reação de conjugação da glutathione reduzida, conferindo caráter mais solúvel e facilitando sua eliminação do organismo (HEMINGWAY; RANSON, 2000; HEMINGWAY, 2000; ENAYATI et al., 2005).

Durante o curso da evolução, alterações na sequência e estrutura dessas enzimas resultaram em diversificação funcional em termos de química, atividade e/ou especificidade para o substrato (FROVA, 2006). Além da função detoxificante, este grupo de enzimas está ligado à biossíntese de hormônios esteróides e à degradação de aminoácidos aromáticos; pode ter papel na resposta adaptativa ao estresse celular (FROVA, 2006; LI et al., 2007) e proteção no intestino médio de *A. aegypti*, por meio da redução do heme ingerido no repasto (LUMJUAN et al., 2007).

Frova (2006) sugere a existência de três subfamílias de GSTs, classificadas de acordo com a localização celular: as GSTs citosólicas (cGST), mais importantes por concentrarem a maioria das GSTs capazes de realizar a conjugação de xenobióticos; as GSTs microssomais e as GSTs kappa. Em insetos, só foi comprovada a existência das duas primeiras subfamílias.

Os níveis de atividade das GSTs variam de acordo com os estágios de vida do inseto. Enayati et al. (2005) citam em seu trabalho que, em *A. aegypti*, a atividade total da GST medida com CDNB e GSH cresceu durante o desenvolvimento larval, atingindo seu pico no estágio pupal e declinando no adulto.

3.3.1.3 Oxidases de Função Mista

As oxidases de função mista ou monooxigenases são enzimas codificadas pelos genes *CYP* (Citocromo P450), que podem estar associadas ao metabolismo oxidativo aumentado, um dos mecanismos mais comuns de resistência. Atuam ligando-se a uma molécula de oxigênio e recebem um elétron da NADPH para introduzir um átomo de oxigênio no substrato, resultando na formação de uma molécula de água (BERGÉ et al., 1998; SCOTT, 1999). O termo “P450” se refere ao pico de absorção em 450 nm que sofre o grupo heme, quando é reduzido e saturado com monóxido de carbono (HEMINGWAY et al., 2004).

De acordo com Liu et al. (2011), as enzimas citocromo P450 têm papel fundamental na detoxificação e/ou ativação de xenobióticos como drogas, pesticidas, toxinas de plantas e produtos químicos mutagênicos e também estão envolvidas no metabolismo de compostos endógenos como hormônios,

ácidos graxos e esteróides. O aumento ou a diminuição da expressão do gene de P450 pode afetar significativamente a disposição de xenobióticos ou compostos endógenos nos tecidos de organismos e, assim, alterar os seus efeitos farmacológicos e toxicológicos (LIU et al., 2011).

A resistência conferida pelas monooxigenases pode ocorrer graças ao aumento da expressão gênica dessas enzimas, pela diminuição da bioativação e por mutações no sítio-ativo da enzima, levando a uma maior capacidade de detoxificação. A expressão de alguns genes P450 de insetos pode ser induzida por ambos os compostos exógenos e endógenos, conhecido como indução. A atividade deste fenômeno provavelmente está envolvida na adaptação de insetos ao seu meio ambiente e, por consequência, no desenvolvimento de resistência aos inseticidas (LIU et al., 2011).

Estão envolvidas no metabolismo de piretróides, organofosforados e carbamatos (HEMINGWAY; RANSON, 2000).

3.3.2 Resistência por Alteração do Sítio-Alvo

A resistência de uma população pode ocorrer por consequência de alterações nos sítios-alvo do sistema nervoso central em que os inseticidas químicos atuam, de forma a impedir totalmente ou dificultar a ligação dos destes aos seus receptores. Esta ação pode comprometer parcial ou integralmente a atividade do xenobióticos em questão (HEMINGWAY et al., 2004; BRAGA; VALLE, 2007b).

Como exemplos de sítio-alvos envolvidos neste tipo de resistência temos a enzima acetilcolinesterase, o receptor neuronal do ácido γ -aminobutírico (GABA) e os canais de sódio dependentes de voltagem (HEMINGWAY et al., 2004).

A causa mais comum da resistência é a presença de mutações pontuais em genes estruturais que codificam proteínas para os canais de sódio e acetilcolinesterase. A resistência é representada pela vantagem biológica dos indivíduos resistentes selecionados pelo uso de inseticidas, e este custo na eficácia biológica tem importantes implicações para a persistência da resistência e para a reversão na suscetibilidade em populações de campo (MONTELLA et al., 2007, 2012).

3.3.2.1 Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é uma importante enzima altamente específica do neurotransmissor acetilcolina (ACh), e age removendo-o das fendas sinápticas, portanto, regulando a transmissão do impulso nervoso (GALLOWAY; HANDY, 2003). A inibição da AChE, causada pelos inseticidas, impede a degradação da acetilcolina resultando em sua acumulação em níveis tóxicos na fenda sináptica, assim, há a propagação irregular do impulso nervoso, causando paralisia e morte (FULTON; KEY, 2001; BRAGA; VALLE, 2007b; DOMINGUES et al., 2010).

Neste caso, a resistência está relacionada à afinidade reduzida da acetilcolina pelo inseticida, o que permite a interrupção normal do estímulo nervoso (BRAGA; VALLE, 2007b).

A enzima é o sítio-alvo de organofosforados e carbamatos, portanto, a quantificação da atividade enzimática da AChE pode indicar se o organismo foi exposto a um desses compostos ou quanto ela será inibida em determinadas concentrações (VALLE; MONTELLA, 2006).

3.3.2.2 Canais de Sódio (Na_v)

O canal de sódio é uma proteína transmembranaral de aproximadamente 2108 aminoácidos, constituída por quatro domínios homólogos (I-IV), cada qual com seis segmentos hidrofóbicos (S1-S6) (MARTINS; LIMA; et al., 2009). A permeabilidade seletiva de íons de sódio através dos canais de sódio voltagem dependente é fundamental para a geração de potenciais de ação em neurônios (YU; CATTERALL, 2003).

O Na_v é o principal sítio de ação dos piretróides, que agem mantendo o canal de sódio aberto, levando a uma propagação contínua de estímulos nervosos que podem levar à morte do inseto. A resistência é resultado da sensibilidade reduzida do canal de sódio aos inseticidas sem causar perda da função primária do sítio-alvo (HEMINGWAY; RANSON, 2000; BRAGA; VALLE, 2007b; MONTELLA et al., 2007).

Essa resistência é conhecida como *Knockdown Resistance (Kdr)*, que ocorre graças à substituição de um aminoácido nos segmentos do gene do

canal de sódio dependentes de voltagem. O termo *kdr* é aplicado quando os insetos, ao entrarem em contato com o inseticida, perdem sua atividade coordenada por um momento e a recuperam em seguida (SAAVEDRA-RODRÍGUEZ et al., 2007; KAWADA et al., 2014).

A mutação *kdr* foi verificada em diversos trabalhos com *A. aegypti* (BRENGUES et al., 2003; SAAVEDRA-RODRÍGUEZ et al., 2007; DAVIES et al., 2007; MARTINS; LINS; et al., 2009; GARCÍA et al., 2009; KAWADA et al., 2009, 2014; MARTINS; LIMA; et al., 2009; YANOLA et al., 2010; HARRIS et al., 2010; OCAMPO et al., 2011; RAJATILEKA et al., 2011; BELINATO et al., 2012; BONA et al., 2012; MCALLISTER et al., 2012; MARCOMBE et al., 2012; MARTINS et al., 2013; STENHOUSE et al., 2013; BRITO et al., 2013; LINSS et al., 2014), e com outras espécies de Culicidae: *Anopheles gambiae* Giles 1926 (MARTINEZ-TORRES et al., 1998; RANSON et al., 2000; DIABATE et al., 2004; DAVIES et al., 2007; SANTOLAMAZZA et al., 2008; NKYA et al., 2014), *Anopheles stephensi* Liston 1901 (ENAYATI et al., 2003), *Anopheles arabiensis* Patton 1905 (HIMEIDAN et al., 2007; KAWADA et al., 2011; MATOWO et al., 2014), *Anopheles funestus* (OKOYE et al., 2008; MORGAN et al., 2010; DJOUAKA et al., 2011; KAWADA et al., 2011; RIVERON et al., 2015; SANDE et al., 2015), *Culex pipiens* Linnaeus 1758 (MARTINEZ-TORRES et al., 1999; AHMED et al., 2012), etc.

Em *A. aegypti*, a mutação mais comum é conferida pela troca de uma adenina por uma guanina no alelo 1016 no sexto segmento (S6) do domínio II, que leva a uma alteração de uma Valina por uma Isoleucina (Val1016Ile) (BRENGUES et al., 2003). Os genes que conferem o *kdr* são recessivos, expressos somente em homozigose. No caso da mutação Val1016Ile, a frequência do alelo mutante em homozigose (Ile/Ile) é maior nos indivíduos resistentes (MARTINS; LINS; et al., 2009).

Embora várias mutações tenham sido identificadas em populações naturais, apenas as substituições Val1016Ile e Phe1534Cys (fenilalanina por cisteína) foram claramente relacionadas com a perda de susceptibilidade a piretróide.

3.4 Reversão da Resistência aos Inseticidas

A reversão da resistência ou da suscetibilidade ocorre quando indivíduos que não estão submetidos à pressão de seleção de inseticidas têm seus níveis de resistência reduzidos ou completamente revertidos. Essa ausência de pressão causa uma instabilidade de alelos de resistência na população e ao longo do tempo, tornam-se suscetíveis (KANGA et al., 2003).

Existem poucos trabalhos relatando a reversão da suscetibilidade a inseticidas químicos em *A. aegypti* (WIRTH; GEORGHIOU, 1999; PRIETO et al., 2002; FONSECA-GONZÁLEZ; QUIÑONES, 2005; MELO-SANTOS et al., 2010; LIMA et al., 2011; PARIS et al., 2011; STRODE et al., 2012; JARAMILLO-OCAMPO et al., 2014).

3.5 Morfometria Geométrica Alar

A morfometria geométrica é um método quantitativo computadorizado para análise estatística da forma e é uma ferramenta padrão em análises numéricas de variação fenotípica em mamíferos e outros organismos (CARDINI; LOY, 2013). A técnica permite analisar as variações morfológicas não detectáveis à observação direta, ou seja, comparar padrões corporais a partir de várias características de uma estrutura corporal (MONTEIRO; REIS, 1999). Essa visualização das diferenças pode ser em grupo ou individual, com múltiplas variáveis simultaneamente e podem-se obter informações de forma e tamanho independentemente (SLICE et al., 2009).

A morfometria geométrica reúne aspectos de geometria, morfometria multivariada, ciência da computação e técnicas de imagem tridimensionais. Começou a ser utilizada há aproximadamente 20 anos e desde então, todos os anos são publicados diversos trabalhos demonstrando seus avanços (CARDINI; LOY, 2013).

No caso dos insetos, as asas são estruturas apropriadas para o trabalho morfométrico por serem bidimensionais, rígidas e com um padrão de venação estável, no qual o cruzamento entre as veias representam marcos anatômicos bem localizados (JIRAKANJANAKIT; DUJARDIN, 2005), além de possuírem

características potencialmente herdáveis e sujeitas à evolução (JIRAKANJANAKIT et al., 2008).

A morfologia de insetos recebe influências tanto genéticas quanto ambientais, e as variações nas características morfométricas relacionadas a tamanho e forma podem fornecer informações relevantes sobre os vários aspectos da biologia dos insetos. É possível estimar o peso do mosquito, o tamanho do corpo, e conseqüentemente, a fecundidade das fêmeas e sua capacidade de transportar patógenos, já que fêmeas maiores podem ingerir maior volume de sangue (JIRAKANJANAKIT; DUJARDIN, 2005; JIRAKANJANAKIT et al., 2007).

Diversos estudos foram realizados utilizando a morfometria geométrica alar de culicídeos para caracterização e identificação de espécies (VIDAL et al., 2011; LORENZ et al., 2012; VARGAS et al., 2013), determinação de dimorfismo sexual (CARRON, 2007; DEVICARI et al., 2011; VIDAL et al., 2012; DHIVYA; MANIMEGALAI, 2013) e detecção de variação populacional (JIRAKANJANAKIT; DUJARDIN, 2005; JIRAKANJANAKIT et al., 2008; HENRY et al., 2010; MORAIS et al., 2010; VIDAL; SUESDEK, 2012; DEMIRCI et al., 2012; MOTOKI et al., 2012; VIDAL et al., 2012; SENDAYDIEGO et al., 2014, 2013; DEMARI-SILVA et al., 2014; JARAMILLO-OCAMPO et al., 2014; GÓMEZ et al., 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

O município de Maringá está situado na região Noroeste do Paraná e é o terceiro maior município do Estado (Figura 2). De acordo com dados do IBGE (2014), possui população estimada de 385.753 mil habitantes, área territorial de 487,052 km² e densidade demográfica de 733,14 hab/km². É cortado pelo Trópico de Capricórnio 25°S e as coordenadas geográficas são 23°25'31"S 51°57'00"O, a 596m de altitude do nível do mar. O bioma do município é a Mata Atlântica e conta com grandes áreas verdes tanto no centro como nas zonas periféricas (CASTELHANO et al., 2012).

A cidade de Maringá localiza-se numa zona de transição climática, entre os climas tropicais propriamente ditos e os climas subtropicais. Segundo Mendonça e Danni-Oliveira (2007), o clima da cidade pode ser classificado entre tropical-úmido-seco (um a três meses secos) e sub-tropical-úmido com inverno fresco/frio. Este clima é caracterizado por chuvas ao longo de todo o ano, com um período de aproximadamente três meses de pouca precipitação, coincidindo com o inverno. Os dados meteorológicos indicam que a temperatura média anual é de 22°C, sendo que a média das temperaturas máximas são 27,8°C e dos meses mais frios (junho e julho) é cerca de 17,4°C. A umidade relativa do ar é de cerca de 70%, com uma média de 119 dias de chuva durante o ano (AQUINO-JUNIOR; MENDONÇA, 2012).

A zona central apresenta o maior adensamento populacional da cidade, assim como o maior processo de verticalização, com diminuição gradativa conforme se afasta do centro, sendo a situação urbana ideal para a formação de ilhas de calor e frescor no contexto da área urbanizada (CASTELHANO et al., 2012). Esta dinâmica térmica, juntamente com as chuvas frequentes, é considerada fator climático ideal para a proliferação e atuação do vetor da dengue e pode ser considerado como um dos principais condicionantes para a formação das epidemias que ocorrem nesta cidade (MENDONÇA, 2003).

Os surtos da doença começaram a aparecer na área em 1995 e permanecem até hoje em maior ou menor intensidade (AQUINO-JUNIOR; MENDONÇA, 2012).



Figura 2. Mapa do estado do Paraná com destaque para a localização do Município de Maringá (em vermelho). Fonte: Modificado de PARANÁ (2010).

4.2 Material Biológico

4.2.1 População de Maringá

O material proveniente do município de Maringá, Paraná, foi fornecido pela Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (SESA) nos períodos de março de 2012 e maio de 2013. As fêmeas realizaram a oviposição em ovitrampas espalhadas por diversos bairros da cidade, que consistem em um recipiente preto de plástico, contendo uma palheta de madeira verticalmente no seu interior e parcialmente cheio de água (Figura 3a) (GOMES, 1998).

As palhetas nas quais houve oviposição foram enviadas ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da UFPR para dar início à indução da eclosão dos ovos em sala de criação. Estas foram colocadas em copos de 700ml de água desclorada, com fornecimento de ração de gato Purina® Cat Chow® triturada como alimento, e então depositados em câmaras do tipo B.O.D. por aproximadamente 48h, sob condições de 25°C de temperatura, umidade controlada e foto período de 12/12 horas. Após esse período, as palhetas foram descartadas e as larvas eclodidas foram transferidas para copos de 300ml com tampa (n=50) e recolocados na câmara B.O.D. sob as mesmas condições de criação.

Assim que ocorreu a emergência dos adultos, foi realizada a triagem de *A. aegypti* e *A. albopictus* e a contagem do número de adultos machos e fêmeas emergidos. Parte desses adultos de *A. aegypti* foi transferida para gaiolas para a criação (Figura 3b) e outra parte foi devidamente armazenada para as realizações dos testes moleculares, enzimáticos e morfométricos: as fêmeas depositadas a seco em freezer a -80°C e os machos em etanol absoluto a -20°C.

Os adultos que permaneceram em gaiola de criação foram alimentados com solução de mel e água desclorada. Semanalmente foi fornecido repasto sanguíneo às fêmeas dos mosquitos. Camundongos da espécie *Mus musculus* foram anestesiados com Thiopentax® 0,5g e colocados por aproximadamente 30 minutos nas gaiolas para a alimentação dos mosquitos. Três dias após o repasto, tempo necessário para a maturação dos ovos (GOMES et al., 2006),

foram colocados nas gaiolas recipientes pretos contendo papel filtro embebidos em água (Figura 3c) como substrato para a oviposição das fêmeas. Os papéis que apresentavam ovos (Figura 3d) foram retirados das gaiolas, colocados para secar e então armazenados, com as identificações referentes à data e geração.

O presente trabalho possui o protocolo de aprovação nº 719 do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/BIO - UFPR).



Figura 3. Ovitrapa com palheta de madeira para oviposição de *Aedes aegypti* (a); Gaiolas de criação (b); Recipiente para oviposição no interior das gaiolas (c); Papel filtro com ovos de fêmeas de *A. aegypti* após realização do repasto sanguíneo (d).

4.2.2 Colônia Rockefeller

Durante o período dos experimentos, em sala isolada, foi mantida a colônia de *A. aegypti* referência de suscetibilidade a inseticidas químicos, denominada Rockefeller.

4.3 Bioensaios de Suscetibilidade

Os bioensaios com larvas foram destinados à detecção e quantificação da resistência de populações de *A. aegypti* ao larvicida organofosforado temefós. Os ensaios com concentração resposta e concentração diagnóstico foram realizados segundo o procedimento proposto pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1981).

4.3.1 Bioensaio Concentração Resposta

A concentração resposta permite testar diversas concentrações do inseticida para obtenção de uma lista de diferentes respostas para a população analisada. É uma ferramenta de monitoramento e análise da resistência em uma população, cujo objetivo é estimar parâmetros quantitativos como a CL50 e CL90, ou seja, as concentrações letais para 50% e 90% da população, respectivamente (BROGDON, 1989).

Para este bioensaio, durante quatro dias, aproximadamente mil ovos de *A. aegypti* foram colocados para eclosão em bandejas plásticas contendo 1L de água desclorada e armazenados em estufas B.O.D. sob as mesmas condições utilizadas na criação. As larvas usadas nos testes eram de aproximadamente 4mm de comprimento, correspondentes ao instar III final ou IV inicial, e provenientes da geração F1 da população de Maringá de 2012 e das gerações F1, F5 e F10 da população de Maringá 2013. Foram realizados quatro experimentos por geração e, para cada um deles, as larvas foram expostas a 11 concentrações de temefós e uma de controle com etanol absoluto (99,5%) em quatro réplicas com 20 larvas, sendo utilizado um total de 3840 larvas por geração.

Para testar a estabilidade do temefós, em cada teste com a população silvestre, foi realizado um bioensaio paralelo com a cepa Rockefeller, em que foram separados 10 copos com larvas ($n=20$), quatro réplicas de CL99 (0,00814 ppm) e $\frac{1}{2}$ CL 99 (0,00407 ppm) e duas réplicas de controle com o solvente etanol 99,5%, totalizando 800 larvas por geração.

O volume final dos copos com as larvas foi de 100 ml de água filtrada, sendo retirados 520 μ l para os testes com população de Maringá e 135 μ l para Rockefeller e preenchidos com temefós e etanol absoluto conforme as concentrações mostradas na Tabela I.

A solução de uso de temefós (6mg/L) foi preparada diariamente diluindo-se a solução estoque de uso comercial Temephos Pestanal[®] grau técnico (marca Sigma-Aldrich) em etanol absoluto.

Tabela I. Concentrações de temefós e etanol absoluto (99,5%) utilizadas nos bioensaios de suscetibilidade com as populações de Maringá (silvestre) e Rockefeller (suscetível). Concentração resposta: C1 a C11; concentração diagnóstico: C6 (0,0162 ppm).

População	Código	Concentrações (ppm)	Temefós (µl)	Etanol (µl)	Volume final (µl)
População Maringá	Controle	0	0	520	520
	C1	0,0012	20	500	520
	C2	0,0042	70	450	520
	C3	0,0072	120	400	520
	C4	0,0102	170	350	520
	C5	0,0132	220	300	520
	C6	0,0162	270	250	520
	C7	0,0192	320	200	520
	C8	0,0222	370	150	520
	C9	0,0252	420	100	520
	C10	0,0282	470	50	520
	C11	0,0312	520	0	520
Cepa Rockefeller	CL99	0,00814	135	0	135
	½ CL99	0,00407	67,5	67,5	135
	Controle	0	0	135	135

As larvas ficaram em câmara B.O.D. a 25°C por 24 horas e então realizada a leitura dos testes e calculada a taxa de mortalidade das larvas. Para obter os resultados das concentrações múltiplas, as concentrações letais (CL50, CL90 e CL99), testes χ^2 e cálculos de intervalos de confiança foram determinados no programa Probit (FINNEY, 1952). As razões de resistência (RR₅₀ e RR₉₅) foram obtidas dividindo-se a concentração letal da população avaliada pela concentração letal correspondente da população Rockefeller. Razões de resistência menores que cinco indicaram baixa resistência; entre cinco e dez, média resistência e acima de dez, alta resistência (WHO, 2013).

4.3.2 Bioensaio Concentração Diagnóstico

O bioensaio concentração diagnóstico consiste em uma dose única ajustada para determinado inseticida, que deve apresentar uma dose letal aos

indivíduos suscetíveis. Classifica apenas qualitativamente os indivíduos em resistentes ou suscetíveis (BROGDON, 1989; BROGDON; MCALLISTER, 1998).

Para este bioensaio, foram utilizados os mesmos resultados que o bioensaio de concentração resposta, porém só foi levada em consideração a concentração diagnóstico de 0,0162 ppm de temefós (C6), que corresponde ao dobro da concentração letal (CL99) das larvas da cepa padrão de suscetibilidade a inseticidas. Populações com porcentagem de mortalidade acima de 98% foram consideradas suscetíveis, entre 80% e 98% com alteração da suscetibilidade e abaixo de 80% resistentes (WHO, 2013).

4.4 Ensaios Moleculares

As análises moleculares foram utilizadas para verificar a mutação Val1016Ile nos alelos que conferem as variações gênicas que levam ao aparecimento da resistência (HEMINGWAY et al., 2004).

Para os ensaios, foram utilizados 30 machos adultos recém-emergidos e não alimentados para cada teste, provenientes da geração F0 da população de Maringá coletadas em 2012 e das gerações F0, F5 e F10 de Maringá de 2013. Os mosquitos foram armazenados a -20°C de temperatura em microtubos de 1,5ml com etanol absoluto.

4.4.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA total foi utilizado o protocolo de Bona et al. (2012). Cada mosquito adulto previamente congelado foi colocado em microtubo de 1,5ml e macerado com homogeneizador em 160µl de tampão de lise (TrisHCl 0,5M + NaCl 4M + EDTA 0,5M). Para a lise das células foram adicionados 25 µl de SDS 10% à amostra e incubados em banho sorológico a 60°C por 30 minutos. Para desproteinização foram adicionados 50µl de clorofórmio álcool isoamílico e centrifugados por 15 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionados 80µl de acetato de amônio (7,5M) e 400µl de etanol 96%. As amostras foram homogeneizadas por inversão e levadas ao congelador a -20°C por 30 min

para precipitação do DNA. Em seguida, as amostras foram centrifugadas novamente por 15 min a 13.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e adicionados 400µl de álcool 70% para lavar o precipitado. Uma nova centrifugação foi feita a 13.000 rpm por 5 min e descartado o sobrenadante cuidadosamente para não perder o pellet. As amostras foram colocadas em estufa a 40°C por 30 min para secagem do material. O DNA foi ressuspensionado em 30µl de TE 1X (TrisHCl 0,5M + EDTA 50mM + Água MilliQ).

Foi realizada a quantificação do DNA com o espectrofotômetro NanoDrop® e as amostras foram armazenadas a -20°C.

4.4.2 PCR alelo-específica

A PCR alelo-específica foi realizada para avaliar a presença da mutação Val1016Ile nas amostras de *A. aegypti*.

Foram utilizados três *primers* (IDT, Coralville, IA, USA), um específico para o aminoácido Val, um específico para Ile e um comum aos dois (Tabela II) (SAAVEDRA-RODRÍGUEZ et al., 2007; MARTINS; LIMA; et al., 2009).

As reações de amplificação foram conduzidas contendo 6,09µl de água Milli-Q, 2,5µl de buffer 5x, 0,25µl de dNTP, 0,30µl do *primer* comum e 0,15µl de cada *primer* específico, 1,5µl de Cloreto de magnésio, 0,065µl de Taq DNA Polimerase (Sigma-Aldrich), 1µl de DNA, sendo o volume de final de 12µl. As reações foram seguidas de acordo com Saavedra-Rodriguez et al. (2007) e Martins et al. (2009), utilizados os seguintes parâmetros de temperatura: desnaturação inicial a 95°C por 5', 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30'', anelamento a 62°C por 45'' e extensão a 72°C por 45''.

Tabela II. Iniciadores utilizados para a mutação Val1016Ile (SAAVEDRA-RODRÍGUEZ et al., 2007; MARTINS; LIMA; et al., 2009).

Aminoácido	Iniciadores (5' – 3')
Val	GCG-GGC-AGG-GCG-GCG-GGG-GCG-GGG-CCA-CAA-ATT-GTT-TCC-CAC-CCG-CAC-CGG
Ile	GCG-GGC-ACA-AAT-TGT-TTC-CCA-CCC-GCA-CT- A
Val/Ile	GGA-TGA-ACC-GAA-ATT-GGA-CAA-AAG-C

4.4.3 Gel de Poliacrilamida

A verificação dos alelos amplificados foi realizada em gel de poliacrilamida 10%, contendo 4µl de amostra da PCR, 2µl do DNA Ladder 50bp (Thermo Scientific) e 1 µl de corante safer dye (KASVI).

Após a eletroforese, a leitura do gel para visualização das bandas foi realizada em transiluminador. A interpretação dos resultados é baseado na leitura das bandas, em que bandas de 78pb correspondem ao alelo mutante (1016Ile) e bandas de 98pb correspondem ao alelo selvagem (1016Val) (Figura 4).

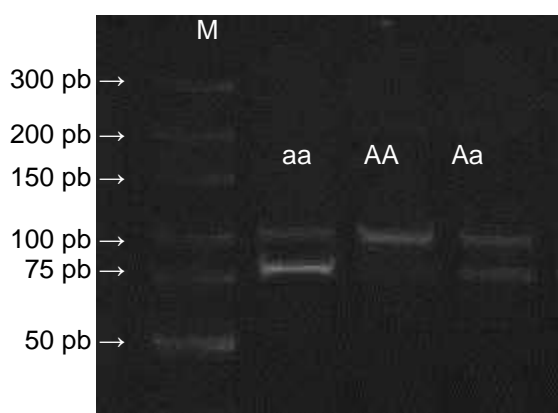


Figura 4. Interpretação dos amplificados obtidos através da PCR alelo-específica do gene envolvido com a resistência aos piretróides. AA: Indivíduo homozigoto dominante para o alelo selvagem (Val/Val); aa: Indivíduo homozigoto recessivo para o alelo mutante (Ile/Ile); Aa: Indivíduo heretozigoto (Val/Ile); M: Marcador de peso molecular de 50 pb (Thermo Scientific).

4.4.4 Análises Estatísticas

A frequência genotípica $f(x)$ representa o número de indivíduos de determinado genótipo (Val/Val, Val/Ile, Ile/Ile) em relação ao número total de indivíduos observados dentro de uma população.

A frequência alélica $f(y)$ representa a porcentagem de ocorrência de determinado alelo (Val ou Ile) em relação ao número total de alelos observados dentro de uma população.

Os genótipos foram avaliados por meio da análise de variância de um fator (ANOVA). Para diferenças significativas ($p < 0,05$), foi realizado o teste de Tukey. As análises foram feitas utilizando o programa Past 3.01 (HAMMER et al., 2001).

4.5 Morfometria Geométrica Alar

4.5.1 Preparação das asas

A metodologia utilizada para a retirada das asas seguiu o protocolo desenvolvido no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV).

Foram utilizadas fêmeas adultas da geração F0 da população de Maringá coletadas em 2012 e das gerações F0, F5 e F10 da população de Maringá coletadas em 2013 (Tabela III). As asas direitas foram retiradas e observadas em microscópio estereoscópico Stemi SV6 Zeiss com o auxílio de estiletos, imersas em solução de hipoclorito de sódio (KOH 10%) por aproximadamente um minuto para remoção das escamas, colocadas em etanol absoluto e, em seguida, montadas em preparação semipermanente entre lâmina e lamínula.

Tabela III. Número de asas usadas nas análises morfométricas de fêmeas de *Aedes aegypti* de cada população.

População	Ano	Geração	Número de Asas
Maringá	2012	F ₀	67
		F ₀	55
	2013	F ₅	80
		F ₁₀	81

4.5.2 Coleta e Análise dos Dados

As imagens das asas foram capturadas em vista dorsal utilizando a câmera Axion Cam ERc5s acoplada a microscópio Carl Zeiss Discovery V20, em aumento de 30x. Primeiramente, as imagens foram agrupadas e modificadas para o formato de arquivo adequado (extensão tps) através do programa TpsUtil 1.58 (ROHLF, 2013). Sobre cada imagem, foram tomadas as coordenadas posicionais de 24 marcos anatômicos (LM) do tipo I, ou seja, pontos no espaço onde há justaposição de tecidos ou onde estruturas se encontram (Figura 5). A quantidade de LM escolhidos para as marcações das asas foi para que houvesse melhor descrição da forma alar e maior representação das diferenças entre as asas, desde a base até o ápice. Os

marcos foram inseridos nos pontos de convergência e divergência das veias alares, distribuídos entre a base e o ápice das asas (Tabela IV), utilizando-se o software TpsDig 2.17 (ROHLF, 2013).

Posteriormente, as coordenadas posicionais foram ordenadas em tabelas de dados no qual cada asa foi representada por uma matriz de coordenadas xy (MONTEIRO; REIS, 1999). No programa MorphoJ 1.06c (KLINGENBERG, 2011) foram realizadas: Análise Generalizada de Procrustes, Análise de Componentes Principais (PCA), Análise de Função Discriminante (DFA) e Análise de Variáveis Canônicas (CVA) e realizado o consenso alar obtido através da ligação dos marcos anatômicos (Figura 6).

A Análise Generalizada de Procrustes foi realizada para a sobreposição, rotação, translação e escalonamento das coordenadas, a fim de determinar o grau de acurácia e evitar erros de medida decorrentes da alocação dos marcos anatômicos (GOODALL, 1991).

A Análise de Componentes Principais foi feita a partir da matriz de variância e covariância das coordenadas de Procrustes e é utilizada para representar os maiores eixos de variação da forma da asa entre populações e verificar o grau de divergência intra e interpopulacionais da amostra. Dentre os componentes gerados em cada comparação, apenas a primeira (PC1) e a segunda (PC2) foram consideradas para a interpretação, já que essas são as análises mais informativas. E para representar a distribuição dos indivíduos em função dos componentes principais foram feitos gráficos de dispersão de pontos, que ilustram as características biológicas avaliadas, como assimetria alar bilateral e diferenciação populacional (KLINGENBERG, 2011).

A Análise de Variáveis Canônicas descreve as diferenciações de forma interpopulacionais em um espaço reduzido. Há redução da dimensionalidade dos dados que passam a ser expostos como variáveis latentes representadas em gráficos bidimensionais. Diante das variáveis canônicas geradas, a primeira (CV1) é a que representa maior resolução de discriminação amostral (MONTEIRO; REIS, 1999; DHIVYA; MANIMEGALAI, 2013).

Também foi avaliado o tamanho do centróide da estrutura, um ponto imaginário que representa o centro geométrico da estrutura e é determinado pela média dos valores posicionais no plano cartesiano de todos os pontos anatômicos de uma mesma estrutura. O tamanho do centróide é um descritor

multivariado do tamanho isométrico da estrutura e varia com o tamanho da asa, sendo uma forma de somar o tamanho dessa estrutura em uma única variável (MONTEIRO; REIS, 1999).

As Análises de Função Discriminante foram realizadas para verificar o grau de alocação correta entre as populações. Foi realizado o teste de reclassificação, em que cada indivíduo é removido da análise, uma nova classificação é realizada com os outros indivíduos e em seguida o indivíduo é reinserido para verificar em que grupo ele é classificado. O teste foi representado em valor percentual (DHIVYA; MANIMEGALAI, 2013). Derivadas dessa análise foram verificadas as distâncias métricas de Mahalanobis para avaliar o grau relativo de similaridade entre as amostras.

Tabela IV. Descrição dos marcos anatômicos inseridos nos pontos de convergência e divergência das veias alares de fêmeas de *Aedes aegypti*, seguindo a nomenclatura morfológica segundo Forattini (1996).

LM	Localização
1	Base da veia costa (C)
2	Junção da veia umeral (h) e subcosta (Sc)
3	Base da veia radial (R)
4	Intersecção da veia cubital anterior (CuA) e cubital posterior (CuP)
5	Base da veia anal (A)
6	Ápice da veia anal (A)
7	Intersecção da veia costa (C) com veia subcosta (Sc)
8	Ápice da veia radio anterior (R_1);
9	Ápice da veia radial (R_2)
10	Ápice da veia radial (R_3)
11	Ramificação da veia radial ($R_4 + 5$)
12	Bifurcação da veia média na mediana anterior ($M_1 + 2$)
13	Bifurcação da veia média na mediana posterior ($M_3 + 4$)
14	Ápice da veia cubital anterior (CuA_1)
15	Ápice da veia cubital posterior (CuA_2)
16	Bifurcação da veia cubital (CuA) em cubital anterior (CuA_1) e cubital posterior (CuA_2)
17	Encontro da veia transversal média-cúbito (m-cu) com a veia cúbito anterior (CuA_1)
18	Encontro da veia transversal radio-média (r-m) com a média (M);
19	Intersecção da veia transversal radio-média (r-m) com radial ($R_4 + 5$)
20	Intersecção da veia setor radial (Rs) com veia radio ($R_2 + 3$)
21	Bifurcação da veia média (M) em média anterior ($M_1 + 2$) e posterior ($M_3 + 4$)
22	Bifurcação da veia radial ($R_2 + 3$) em radial dois (R_2) e radial três (R_3)
23	Bifurcação da veia cúbito anterior (CuA) em cubital anterior um (CuA_1) e cubital anterior dois (CuA_2)
24	Bifurcação da veia rádio (R) em rádio setorial (r1-rs)

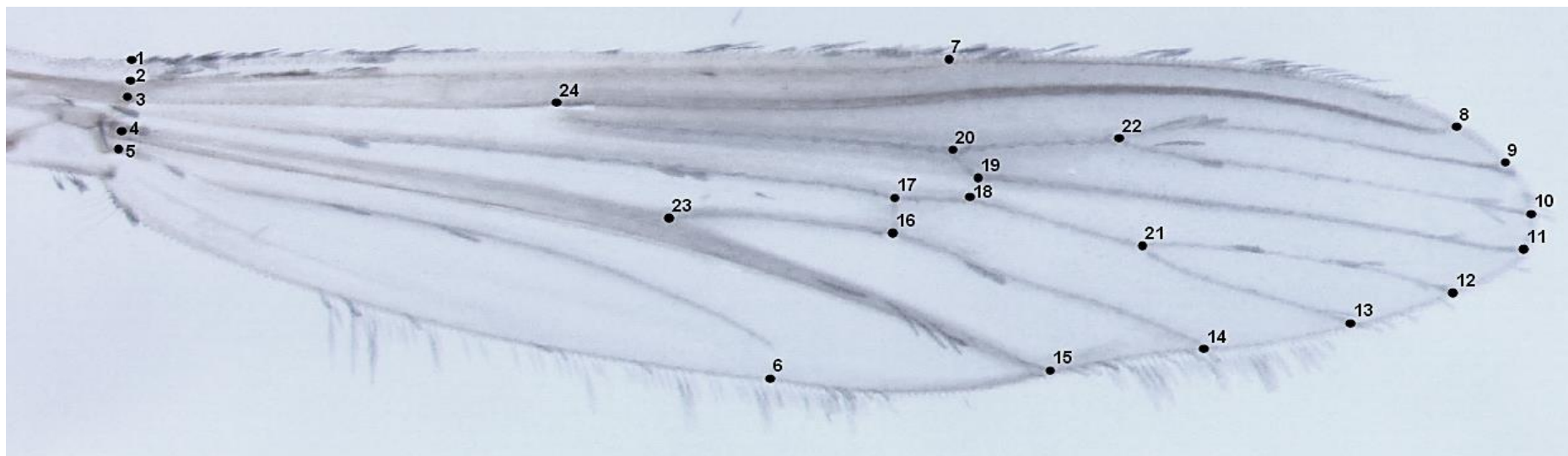


Figura 5. Asa de fêmea de *Aedes aegypti* digitalizada com a posição dos 24 marcos anatômicos (LM) utilizados.

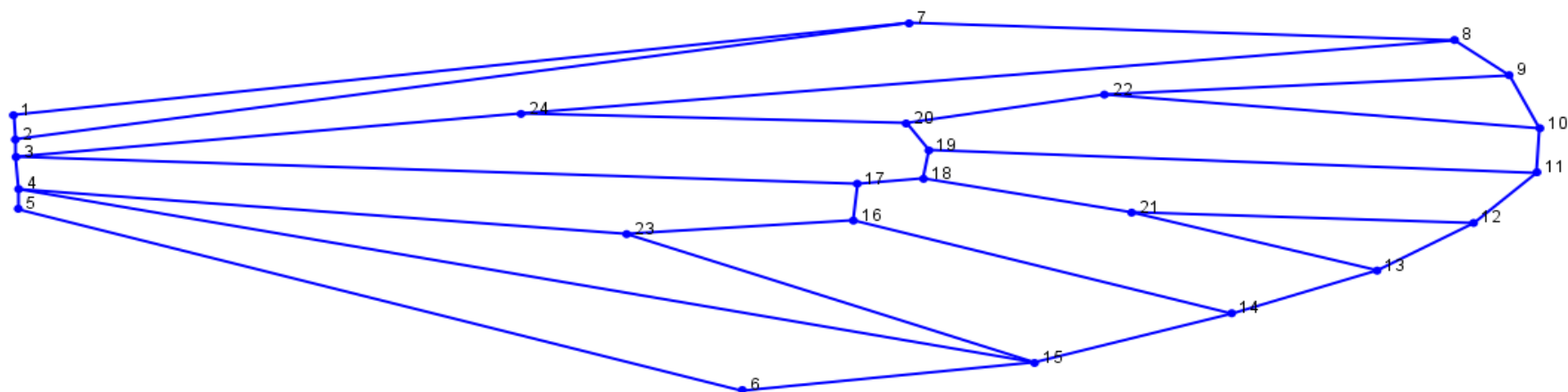


Figura 6. Representação gráfica do consenso alar obtido a partir da ligação dos marcos anatômicos.

4.6 Ensaios Bioquímicos

Os ensaios bioquímicos foram realizados seguindo a Metodologia para Quantificação de Atividade de Enzimas Relacionadas a Inseticidas em *A. aegypti*, elaborado pelo Ministério da Saúde e Fundação Oswaldo Cruz (VALLE et al., 2006). São empregados para determinar os mecanismos envolvidos com a resistência em determinada população exposta a inseticidas de diversas classes, através da verificação da atividade de enzimas envolvidas com a resistência metabólica (Esterases, Glutathione-S-Transferases, Oxidases de Função Mista) e com a resistência ao sítio alvo (Acetilcolinesterase) (VALLE; MONTELLA, 2006; MONTELLA et al., 2007).

Todos os ensaios quantificaram a atividade enzimática, com exceção do teste de oxidase de função mista (MFO), que é uma medida indireta do conteúdo da enzima, uma vez que quantifica o grupamento heme, seu grupamento prostético (VALLE; MONTELLA, 2006).

As reações foram feitas em microplacas contendo 96 poços e a absorbância foi lida em espectrofotômetro de microplacas BioTek com comprimento de onda de 405nm, de acordo com o método Ellman et al. (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). Cada enzima apresenta um protocolo, um tempo de reação e uma unidade de medida específica.

4.6.1 Preparação do material

Para os ensaios, foram utilizadas fêmeas adultas de um dia de vida e não alimentadas com sangue, provenientes da geração F0 da população de Maringá coletadas em 2012 e das gerações F0, F5 e F10 de Maringá de 2013. As fêmeas foram colocadas ainda vivas em microtubos de 1,5 ml, em grupos de 40 a 50, e armazenadas a -80°C de temperatura. Foi utilizado um total de 80 fêmeas para cada teste.

Antes dos testes com as populações, para todas as enzimas discriminadas, foi obtido o perfil da cepa referência de suscetibilidade através da realização de três ensaios completos. Este perfil foi utilizado como controle interno para comparação com as populações de campo.

Imediatamente antes da utilização nos testes, os tubos contendo os mosquitos foram retirados do congelador e mantidos em gelo durante todo o processo a fim de reduzir a proteólise.

Os testes para cada enzima foram realizados em duplicata em microplacas transparentes, contendo 96 poços. Em cada ensaio foram utilizadas 45 fêmeas, sendo os microtubos enumerados de 1 a 40 para a população de campo e de 41 a 45 para a cepa Rockefeller. Os seis poços restantes foram preenchidos pelo branco (controle negativo) e pelo controle positivo, quando existentes.

Os mosquitos foram colocados individualmente em microtubos e homogeneizados em água deionizada (Milli-Q), com o auxílio de um homogeneizador automático. As alíquotas para os testes de AChE e MFO foram separadas e então centrifugado o restante da amostra a 12.000g por 60 segundos para a realização dos demais testes.

4.6.2 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

Duas microplacas transparentes foram identificadas como AChE e AChI. Na microplaca AChE foi medida a atividade de acetilcolinesterase, enquanto na microplaca AChI mediu-se a atividade desta enzima na presença do inibidor carbamato propoxur. O princípio do método é o desenvolvimento da reação colorida que ocorre entre a colina e o DTNB na presença da acetilcolinesterase.

Esta é a única enzima, entre as testadas, cujos valores não precisam ser corrigidos pelo total de proteínas e pelo volume de homogeneização dos mosquitos.

Os resultados de AChE são expressos em percentual de atividade após a adição do inibidor, ou seja, é avaliada a diferença entre os resultados de atividade obtidos na ausência (AChE) e na presença do inibidor (AChI).

4.6.3 Atividade da Oxidase de Função Mista

No teste com a MFO não é possível medir diretamente a atividade de monooxigenação da P450 sobre o substrato. Para inferir sobre a atividade da

enzima é feita a quantificação do grupamento heme presente nos insetos, portanto, quanto maior o conteúdo do heme, maior a atividade da enzima.

O princípio do método é o desenvolvimento da reação colorida que ocorre entre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o TMBZ na presença do Citocromo C.

A cada nova bateria de testes com a população de campo foi realizada a média de três curvas-padrão de citocromo C, que contém o grupamento heme. Esta curva-padrão permite converter os valores de absorbância obtidos com os homogenatos de mosquito em conteúdo de citocromo, apresentados em μg de citocromo por miligrama de proteína total dos mosquitos (μg cit/mg ptn).

4.6.4 Atividades das Esterases Alfa (α -EST) e Beta (β -EST)

Os testes de α -EST e β -EST baseiam-se, respectivamente, no consumo do substrato α -naftil pela enzima α -EST, transformando-o em α -naftol, e no consumo do substrato β -naftil pela enzima β -EST, transformando-o em β -naftol. Quando o corante Fast Blue é acrescentado, a reação é interrompida imediatamente e as quantidades dos produtos alfa-naftol e beta-naftol podem ser medidas através da coloração produzida. Os resultados são expressos em nmol/mg ptn/min. Em cada novos testes com a população de campo foram feitas curvas-padrão de α -naftol e β -naftol para a correção dos valores de absorbância obtidos nas alíquotas.

4.6.5 Atividade da Esterase PNPA

Para este ensaio, ao contrário dos testes com as α -EST e β -EST, não se usa um substrato padrão. Nesse caso não é necessária a construção de curva-padrão nem a conversão dos valores de absorbância em quantidade de substrato consumido. O resultado é expresso em $\Delta Abs/mg$ ptn/min, ou seja, calcula-se a absorbância em um minuto e depois faz-se a correção para o conteúdo de proteína de cada mosquito.

4.6.6 Atividade da Glutathione S-Transferase (GST)

Para este ensaio deve ser calculada a quantidade de substrato utilizada na reação e os valores devem ser corrigidos pelas proteínas totais. As soluções de trabalho são GSH e CDNB e o resultado final do ensaio é expresso em nmoles/mg ptn/min, que corresponde à quantidade do produto de reação gerado por minuto, por mg de proteína.

4.6.7 Quantificação de Proteína Total (PTN)

Foi quantificada a concentração total de proteína para cada mosquito de acordo com o método descrito por Bradford (1976) a fim de utilizá-la como base para a normalização dos valores de atividade das enzimas relacionadas à resistência metabólica. Foi necessária a realização da curva-padrão de proteína com BSA para a correção dos valores de absorbância obtidos nas alíquotas.

4.6.8 Análises

Em trabalho realizado por Valle e Montella (2006) foi definida uma classificação para a adequada representação das diferenças funcionais de atividade enzimática, baseada no uso do percentil 99 (p99) da cepa referência Rockefeller. Foi contabilizado o percentual de indivíduos das populações que apresentaram atividade superior ao p99 da cepa Rockefeller, e valores entre 0 e 15 foram classificados como “atividade enzimática normal” ou “não alterada”; entre 15 e 50 como “atividade enzimática alterada”; e superiores a 50 como “atividade enzimática muito alterada”.

Além do percentil 99, foram realizadas as análises estatísticas e representações gráficas, para facilitar a comparação direta da atividade entre as populações e a linhagem de referência Rockefeller, permitindo a visualização do nível de alteração de atividade. Deve-se considerar que os perfis enzimáticos não devem necessariamente seguir uma distribuição normal, principalmente quando o status de resistência foi recentemente alterado em uma população (MONTELLA et al., 2007).

O programa utilizado para as análises e gráficos foi o GraphPad Prism versão 6.0.

5 RESULTADOS

5.1 Bioensaios de Suscetibilidade

5.1.1 Bioensaio Dose Resposta

Em todos os bioensaios, a razão de resistência 95 foram superiores a três (Tabela V). No bioensaio realizado com a geração F1 de 2013 foram encontradas as maiores CL50 (0,0133) e CL95 (0,0621) e, conseqüentemente, a maior RR₉₅ (9,86). Na quinta geração a RR₉₅ diminuiu para 5,37 e na décima geração para 4,94.

Em todos os casos a heterogeneidade das amostras foi maior que na cepa Rockefeller, de acordo com os valores do *slope*.

Tabela V - Concentrações letais de temefós para 50% (CL50) e 95% (CL95) das larvas de *Aedes aegypti*, respectivos intervalos de confiança (95%) e razões de resistência (RR), qui-quadrado (χ^2) e *slope* obtidos através de bioensaios com concentração resposta do inseticida.

População	CL 50 (95% IC)	CL 95 (95% IC)	RR ₅₀	RR ₉₅	Slope	χ^2 p($\alpha=0,05$)
Rockefeller	0,0034 (0,0033-0,0034)	0,0063 (0,0063-0,0067)	-	-	6,14	7,37
Maringá 2012 F ₁	0,0053 (0,0049-0,0058)	0,0194 (0,0179-0,0213)	1,57	3,08	2,94	8,19
Maringá 2013 F ₁	0,0133 (0,0126-0,0140)	0,0621 (0,0542-0,0730)	3,91	9,86	2,46	8,17
Maringá 2013 F ₅	0,0107 (0,0101-0,0112)	0,0339 (0,0311-0,0373)	3,13	5,37	3,27	7,45
Maringá 2013 F ₁₀	0,0092 (0,0086-0,0098)	0,0312 (0,0286-0,0343)	2,70	4,94	3,10	6,29

5.1.2 Bioensaio Dose Diagnóstico

A partir do bioensaio baseado na concentração diagnóstico de 0,0062ppm, calibrado com a cepa Rockefeller, obteve-se (Tabela VI) que a geração F1 da população de Maringá proveniente do campo em 2012 apresentou o status “alteração de suscetibilidade” ao temefós (90,41% de

mortalidade), enquanto na de 2013 o status foi alterado para “resistente”, com 49,1% de mortalidade.

No decorrer das gerações F5 e F10, o status permaneceu como “resistente”, porém a mortalidade foi maior, com 72,8% e 73,9%, respectivamente.

Tabela VI - Status de suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* do município de Maringá em diferentes anos e entre as gerações, baseados na concentração diagnóstico de 0,062ppm.

População	Mortalidade (%)	Classificação
Rockefeller	100	Suscetível
Maringá 2012 F ₁	90,4	Alteração de suscetibilidade
Maringá 2013 F ₁	49,1	Resistente
Maringá 2013 F ₅	72,8	Resistente
Maringá 2013 F ₁₀	73,9	Resistente

5.2 Ensaio Moleculares

5.2.1 Frequência Genotípica

Foi realizada a genotipagem de 120 indivíduos, sendo 30 de cada população. Ao comparar as gerações F0 das populações provenientes de campo (Tabela VII), o genótipo homozigoto dominante (Val/Val) aparece em 28,3% dos indivíduos analisados, o heterozigoto (Val/Ile) em 16,7% e o homozigoto recessivo (Ile/Ile) em 55%.

Referente ao resultado entre as gerações da população de 2013, a frequência genotípica do homozigoto dominante (Val/Val) aumenta no decorrer das gerações F5 e F10; no heterozigoto (Val/Ile) há um aumento da frequência em F5 e diminuição em F10, enquanto em Ile/Ile a frequência foi maior em F0. O genótipo Ile/Ile foi o mais frequente em todos os testes ($p=0,049$; $F=4,273$).

Tabela VII - Frequência genotípica da mutação Val1016Ile do canal de sódio voltagem-dependente nas populações de campo (F₀ de 2012 e 2013) e no decorrer das gerações F₅ e F₁₀ da população de 2013. Val/Val: homozigoto dominante, Val/Ile: heterozigoto e Ile/Ile: homozigoto recessivo.

População	n	Frequência Genotípica		
		Val/Val	Val/Ile	Ile/Ile
Maringá 2012 F ₀	30	0,37	0,23	0,40
Maringá 2013 F ₀	30	0,20	0,10	0,70
Maringá 2013 F ₅	30	0,40	0,27	0,33
Maringá 2013 F ₁₀	30	0,43	0,20	0,37

5.2.2 Frequência Alélica

A frequência alélica de 1016Val (alelo selvagem) diminuiu de 0,48% em F₀ 2012 para 0,25% em F₀ 2013, demonstrando um consequente aumento na frequência alélica do alelo mutante (1016Ile) de um ano para outro (Figura 7).

No decorrer de cinco gerações, sob a ausência da pressão de inseticidas, a frequência do alelo mutante, que confere resistência quando em homozigose, diminuiu, e nas gerações seguintes se manteve constante.

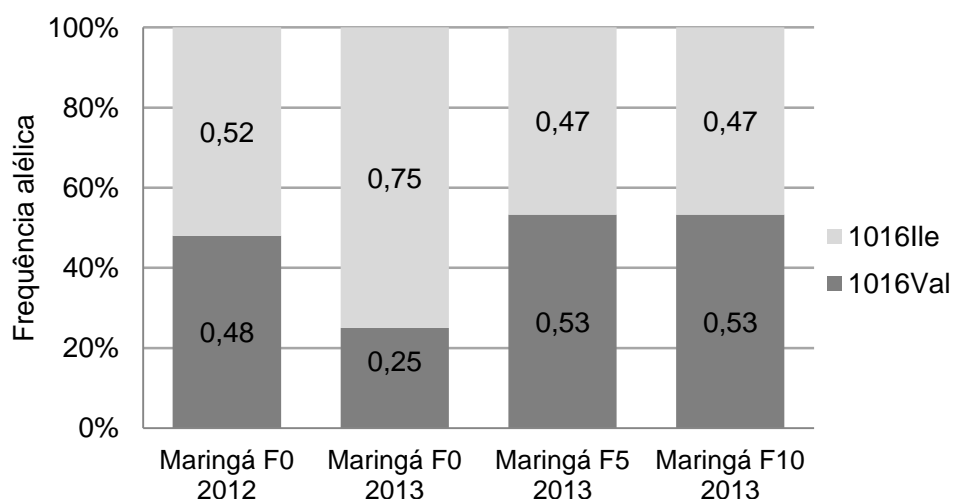


Figura 7. Frequência dos alelos selvagem (1016Val) e mutante (1016Ile) para a mutação Val1016Ile do canal de sódio voltagem-dependente nas populações de Maringá de campo (F₀ 2012 e F₀ 2013) e no decorrer das gerações F₅ e F₁₀ da população de 2013.

5.3 Morfometria Geométrica Alar

Os indivíduos das populações de *A. aegypti* analisados apresentaram diferenças significativas no tamanho do centróide e na forma da asa (Tabela VIII).

Tabela VIII. Análise estatística (ANOVA) do tamanho do centróide e da forma das asas dos indivíduos em geral. SS: soma dos quadrados; MS: média dos quadrados; df: grau de liberdade.

	Efeito	SS	MS	df	F	p
Tamanho centróide	Indivíduos	3590229	1196743	3	23,50	<0,0001
	Erro	14205700	50916	279		
Forma	Indivíduos	0,01063	0,0000805	132	6,47	<0,0001
	Erro	0,15273	0,0000124	12276		

A análise de componentes principais gerou 44 eixos de variação, sendo que os dois primeiros juntos explicam 36,5% da variação da forma. O PC1 explica 25,7% da variação total, enquanto o PC2 explica 10,8%.

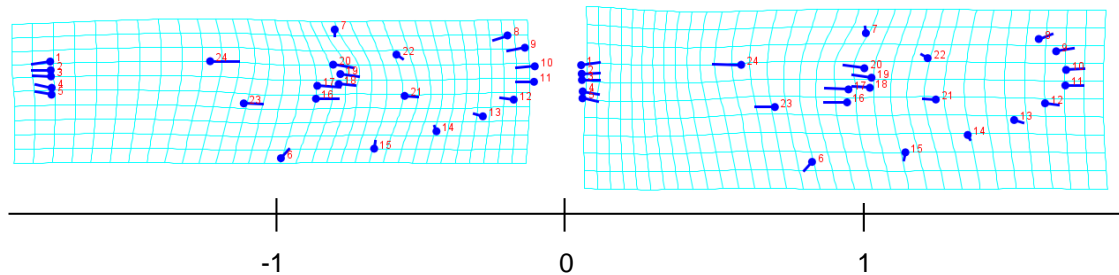
No primeiro componente principal (Figura 8a), no quadrante negativo os vetores centrais e os do ápice das asas se aproximam um do outro, diminuindo a margem apical; os LM laterais (6, 7, 14 e 15) também se aproximam do centro, enquanto os vetores da base se direcionam ao sentido oposto do central, aumentando a margem basal. Dessa forma, os indivíduos nesse quadrante possuem asa com a região basal e mediana alongadas e ápice encurtado.

No quadrante positivo, as deformações ocorrem em sentido convergente entre a região basal e central, e no sentido divergente entre o centro e o ápice. Ocorreu expansão nos pontos laterais (6, 7, 14 e 15). Os indivíduos de *A. aegypti* que se posicionaram neste quadrante possuíram asas com a região basal e central encurtadas, ápice dilatado e largura aumentada.

Em PC2 (Figura 8b), no quadrante negativo os LM 6, 7, 15, 23 e 24, componentes da área central da asa, se direcionam à região basal, os LMs 16 a 21 se direcionam para o ápice, os LM do ápice se estendem e a região basal apresenta um leve direcionamento para o centro. Em geral, o tamanho da asa permanece o mesmo, porém as deformações presentes nos marcos anatômicos denotam uma asa com a região anal e apical estendidas, região entre base e centro mais comprida e entre centro e ápice reduzida.

No eixo positivo, os sentidos dos pontos são opostos ao eixo negativo, resultando em lâmina alar expandida na margem costal (LM 7), ápice afilado, LM 6 deslocado para o ápice e porção entre ápice e centro mais comprido.

(a) PC1 (25,7%)



(b) PC2 (10,8%)

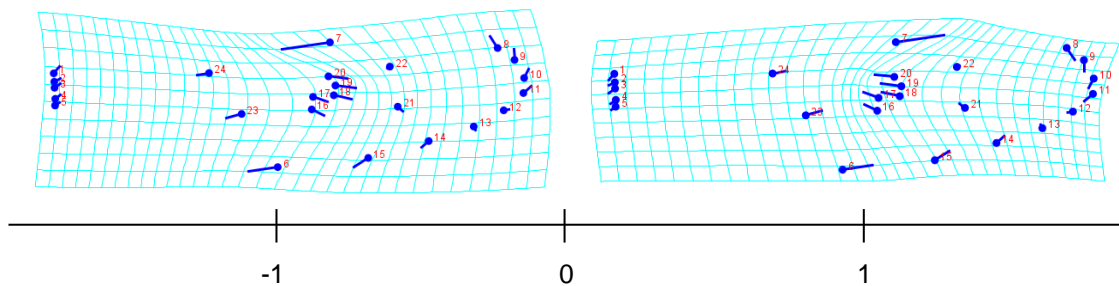


Figura 8. Deformações dos 24 marcos anatômicos evidenciados no (a) primeiro e no (b) segundo componentes principais, escores negativo e positivo.

A análise de variáveis canônicas mostrou diferenciação entre as populações, porém com intersecção no morfoespaço das variáveis canônicas (Figura 9).

Foram gerados três eixos de variação, sendo que os dois primeiros CVs explicam 86,9% dos resultados (CV1=48,4%; CV2=38,5%).

Em CV1 (Figuras 9 e 10a), as populações presentes no quadrante negativo (Maringá 2013 F5 e F10) tendem a apresentar asas com regiões basal e mediana divergindo-se uma da outra, e regiões mediana e apical aproximando-se, com exceção do LM 7 que está direcionado para a base. Em CV1 positivo estão alocadas as gerações parentais de 2012 e 2013. São representadas por asas cujas regiões mediana e basal são convergentes, e por

consequência, encurtadas, e regiões mediana e apical divergentes e alongadas, exceto LM 7 que está direcionado para o ápice da asa.

Em CV2 (Figuras 9 e 10b), o quadrante negativo representa os indivíduos da geração F5, cujas regiões da base e do ápice se mantêm inalteradas, havendo um deslocamento da região central em direção ao ápice e região costal direcionando-se para o centro, dando origem a asas mais estreitas. Estão agrupados no quadrante positivo as gerações parentais de 2012 e 2013 e F10 de 2013, com região central deslocada para a base e asas mais largas lateralmente, graças à expansão exterior do marco 7.

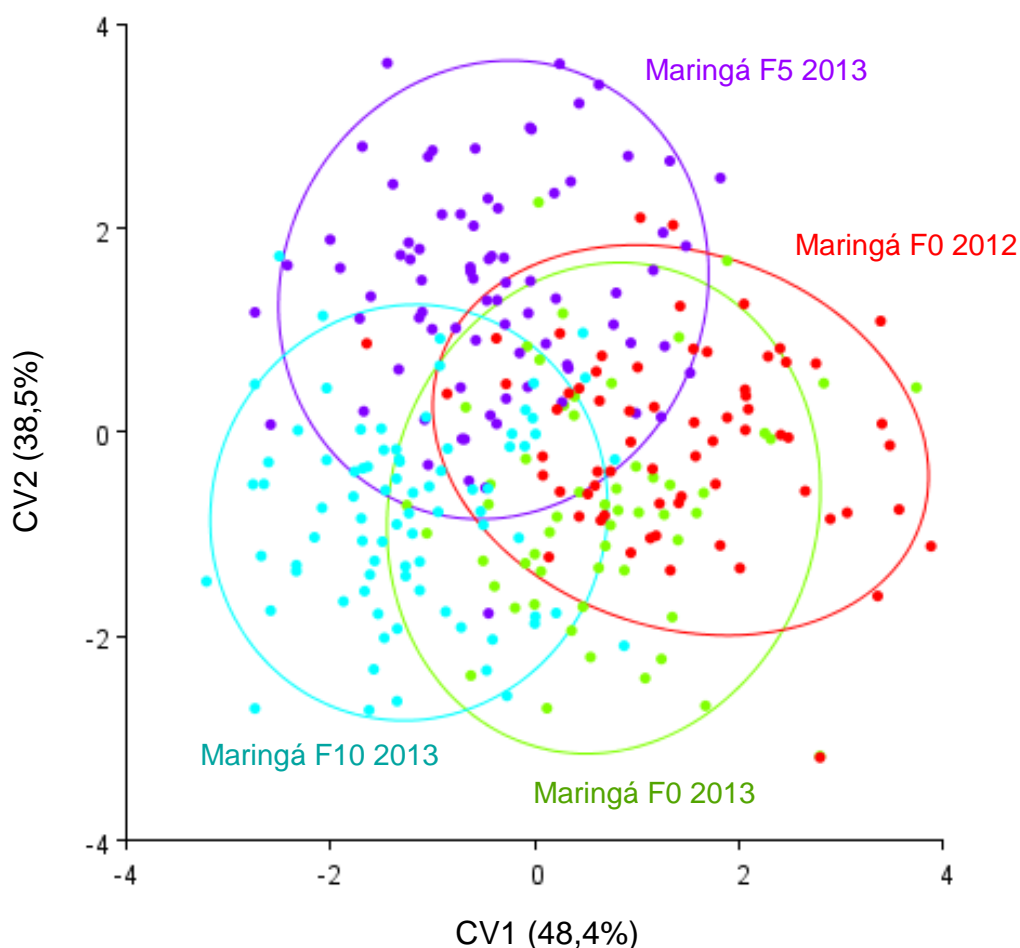
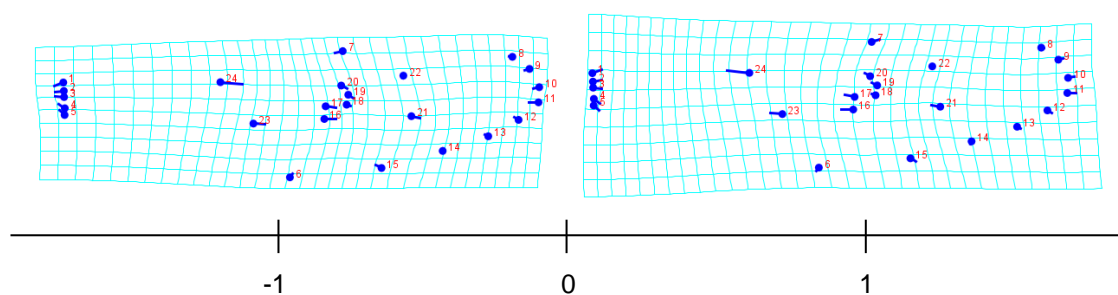


Figura 9. Análise de variáveis canônicas referente à forma das asas de *A. aegypti* das populações estudadas.

(a) CV1 (48,4%)



(b) CV2 (38,5%)

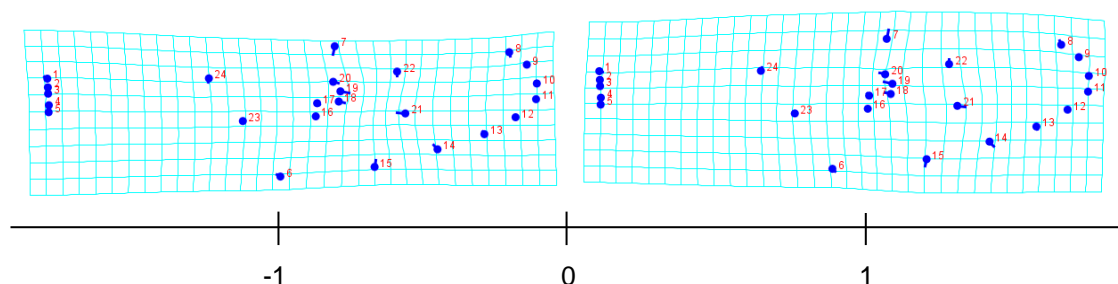


Figura 10. Deformações dos 24 marcos anatômicos evidenciados no (a) primeiro e no (b) segundo eixo canônico, escores negativo e positivo.

A posição dos indivíduos no espaço formado pelos eixos canônicos pode ser usada para determinar a qual população pertence o indivíduo. O grau de alocação entre as populações (Tabela IX) teve a menor variação entre as populações F0 dos dois anos (68%) e a maior entre as gerações F0 e F5 de 2013 (80%). As distâncias de Mahalanobis foi menor entre os F0 2012 e 2013, ou seja, foi esse o agrupamento mais próximo.

Tabela IX. Distância de Mahalanobis (triângulo superior) ($P < 0,0001$) e percentuais de acerto e confiabilidade na separação das populações obtida através da validação cruzada da análise discriminante (triângulo inferior).

Populações	MgáF0 2012	Mgá F0 2013	Mgá F5 2013	Mgá F10 2013
Mgá F0 2012	-	1,8402	2,4628	2,7750
Mgá F0 2013	68	-	2,5125	2,2616
Mgá F5 2013	70	80	-	2,3778
Mgá F10 2013	74	76	79	-

5.4 Ensaios Bioquímicos

Para AChE, o percentual de atividade foi de 45,6% em F0 2012 e caiu para 21,3% em F0 2013. No decorrer das gerações, o status da atividade enzimática mudou de “alterado” para “muito alterado”, chegando a 100% de indivíduos com valor superior ao p99 da cepa Rockefeller na geração F10 (Tabela X). As análises estatísticas também demonstraram a redução do percentual de atividade de 2012 para 2013 (Figura 11a) e o aumento das atividades no decorrer das gerações, diferindo uma da outra (Figura 12a).

Os resultados para MFO inferiram que a atividade foi classificada como “não alterada” em todas as populações, ou seja, equivalente à cepa referência (Tabela X). Nas representações gráficas, a atividade da enzima nas populações de campo foi menor que na cepa Rockefeller, sendo ambas estatisticamente diferentes de Rock, mas não diferindo entre si (Figura 11b). Entre as gerações (Figura 12b), todos os perfis enzimáticos apresentaram-se diferentes de Rock, com menores atividades.

Para GST o status variou de “atividade alterada” em F0 2012 para “atividade não alterada” em F0 2013, aumentando entre as gerações, até chegar ao status de muito alterada em F10 (Tabela XI). As populações parentais não diferiram entre si, mas diferiram de Rock, apresentando perfil atividade maior que esta (Figura 11c). Entre as gerações, as atividades foram iguais entre MgáF0 e MgáF5, sendo maior que Rock e menor que MgáF10. Esta foi a que apresentou maior perfil de atividade, diferindo dos demais (Figura 12c).

O status da atividade de α -EST foi “atividade alterada” em todas as populações, exceto na geração F5 (Tabela XI). Mgá2013 apresentou atividade similar à Rock, enquanto Mgá 2012 diferiu de ambas (Figura 11d). Nas análises com as populações de 2013, as gerações F0, F5 e F10 diferiram entre si, porém apenas F10 diferiu de Rock, sendo a que apresentou maior atividade enzimática (Figura 12d).

Em β -EST, o status “atividade enzimática normal” foi verificado em todos os testes realizados, sendo a maior atividade encontrada na geração F10 de 2013 (Tabela XII). Na comparação gráfica entre as gerações parentais, embora o desvio padrão tenha sido maior para 2012, a atividade enzimática observada

foi similar à de Rock, e ambas diferentes de 2013 (Figura 11e). Nos resultados entre as gerações, F5 foi a única estatisticamente diferente das demais, sendo esta a com menor padrão de atividade (Figura 12e).

O status de atividade da PNPA entre as gerações parentais foi “normal”: em 2012 foi de 13,5% e 2013 reduziu para 6,9%. Nas gerações F5 e F10 a atividade aumentou para 25,5% e 36,5%, respectivamente, passando para o status “alterado” (Tabela XII). Nas análises estatísticas as populações parentais diferiram de Rock e foram estatisticamente semelhantes entre si (Figura 11f). Entre as gerações, Rock foi diferente de todas as gerações, assim como F0. Já F5 e F10 não diferiram, sendo os que apresentaram maior atividade enzimática (Figura 12f).

Tabela X - Quantificação da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) e da oxidase de função mista (MFO) em fêmeas de *Aedes aegypti*.

Populações	AChE (% de atividade)					MFO (ug cit/mg ptn)				
	N	med	SD	p99		N	med	SD	p99	
Rockefeller	135	15,1	3,0	21,8		135	36,9	7,7	56,86	
	N	med	SD	N>p99	% >p99	N	med	SD	N>p99	% >p99
Maringá 2012 F0	79	21,3	7,8	36	45,6	80	22,6	9,3	0	0
Maringá 2013 F0	80	18,0	4,2	17	21,3	78	23,3	6,6	0	0
Maringá 2013 F5	80	22,2	8,1	42	52,5	80	11,8	5,3	0	0
Maringá 2013 F10	80	28,4	4,5	80	100	80	16,0	12,9	1	1,3

N: número de indivíduos utilizados nos ensaios; med: mediana; SD: desvio padrão;

p99: percentil 99 da cepa Rockefeller;

N>p99: número de indivíduos com atividade enzimática superior ao percentil 99 da cepa Rockefeller;

%>p99: porcentagem de indivíduos com atividade enzimática superior ao percentil 99 da cepa Rockefeller.

*os valores de atividade enzimática obtidos para cada indivíduo foram corrigidos pelos respectivos valores de proteína, exceto acetilcolinesterase (AChE).

- Atividade enzimática normal
- Atividade enzimática alterada
- Atividade enzimática muito alterada

Tabela XI - Quantificação da atividade enzimática de glutathione S-transferase (GST) e esterase α (α -EST) em fêmeas de *Aedes aegypti*.

Populações	GST (mmoles/mg ptn/min)					α -EST (nmol/mg ptn/min)				
	N	med	SD	p99		N	med	SD	p99	
Rockefeller	132	0,8	0,4	1,99		135	13,0	2,3	18,54	
	N	med	SD	N>p99	% >p99	N	med	SD	N>p99	% >p99
Maringá 2012 F0	78	1,4	0,6	14	17,9	80	17,6	7,8	32	40
Maringá 2013 F0	78	1,3	0,5	7	9	78	13,8	4,1	12	15,4
Maringá 2013 F5	80	1,5	0,5	16	20	80	11,9	3,9	4	5
Maringá 2013 F10	80	2,4	1,6	48	60	80	15,9	11,1	29	36,3

Tabela XII - Quantificação da atividade enzimática de esterase β (β -EST) e esterase PNPA (PNPA-EST) em fêmeas de *Aedes aegypti*.

Populações	β -EST (nmol/mg ptn/min)					PNPA-EST (Δ Abs/mg ptn/min)				
	N	med	SD	p99		N	med	SD	p99	
Rockefeller	135	17,7	5,3	31,48		119	1,4	1,0	3,87	
	N	med	SD	N>p99	% >p99	N	med	SD	N>p99	% >p99
Maringá 2012 F0	80	17,1	7,8	5	6,3	74	1,7	1,5	10	13,5
Maringá 2013 F0	78	14,7	5,1	0	0	72	2,2	1,1	5	6,9
Maringá 2013 F5	80	8,9	3,3	0	0	47	2,7	1,6	12	25,5
Maringá 2013 F10	80	14,7	13,4	12	15	63	3,0	2,0	23	36,5

N: número de indivíduos utilizados nos ensaios; med: mediana; SD: desvio padrão;

p99: percentil 99 da cepa Rockefeller;

N>p99: número de indivíduos com atividade enzimática superior ao percentil 99 da cepa Rockefeller;

%>p99: porcentagem de indivíduos com atividade enzimática superior ao percentil 99 da cepa Rockefeller.

*os valores de atividade enzimática obtidos para cada indivíduo foram corrigidos pelos respectivos valores de proteína, exceto acetilcolinesterase (AChE).

- Atividade enzimática normal
- Atividade enzimática alterada
- Atividade enzimática muito alterada

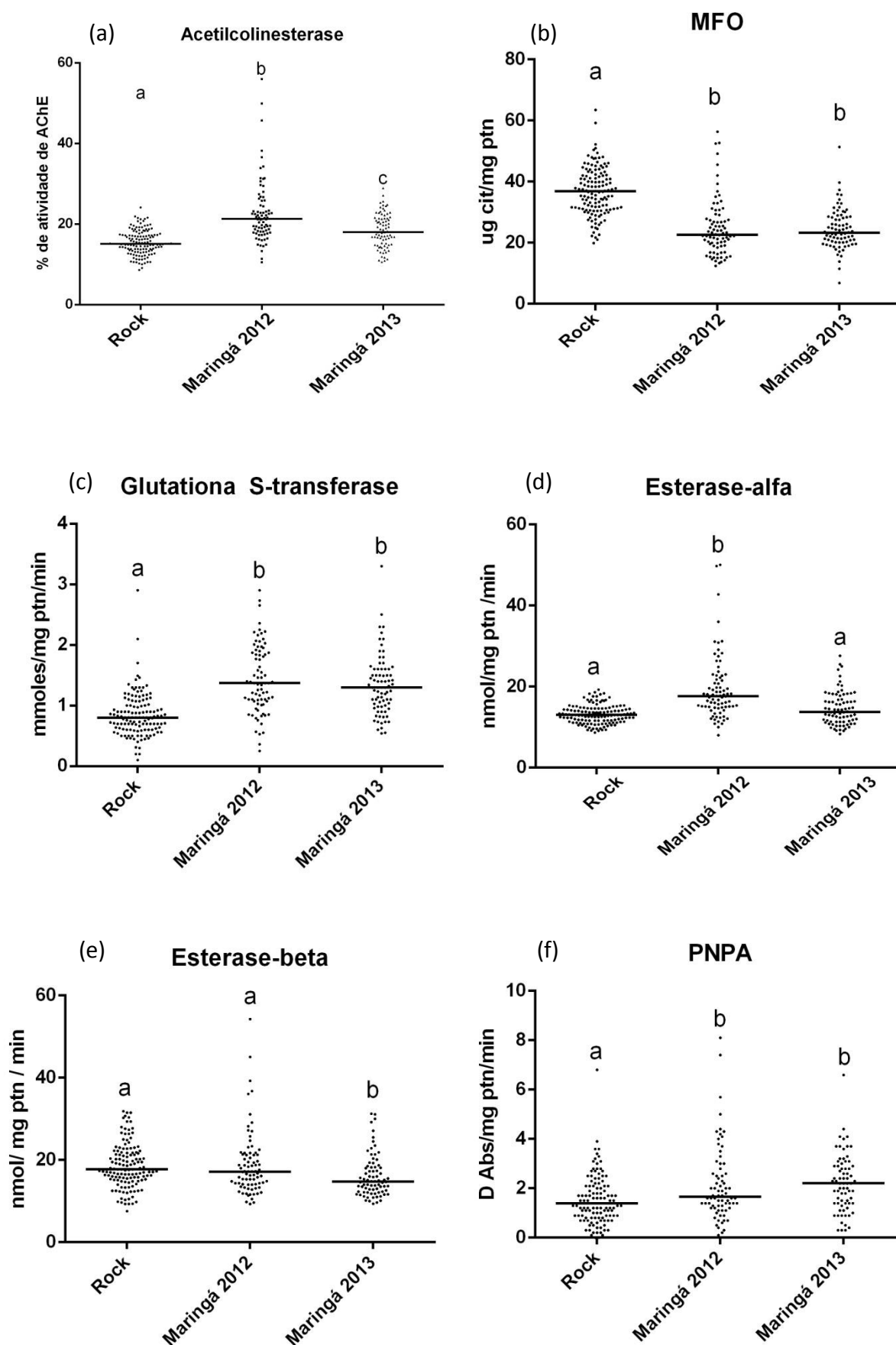


Figura 11. Perfil de atividade enzimática e mediana de acetilcolinesterase (a), oxidase de função mista (b), glutathiona S-transferase (c), esterase α (d), esterase β (e) e esterase PNPA (f) de fêmeas de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller (Rock) e da geração F0 de Maringá 2012 e Maringá 2013.

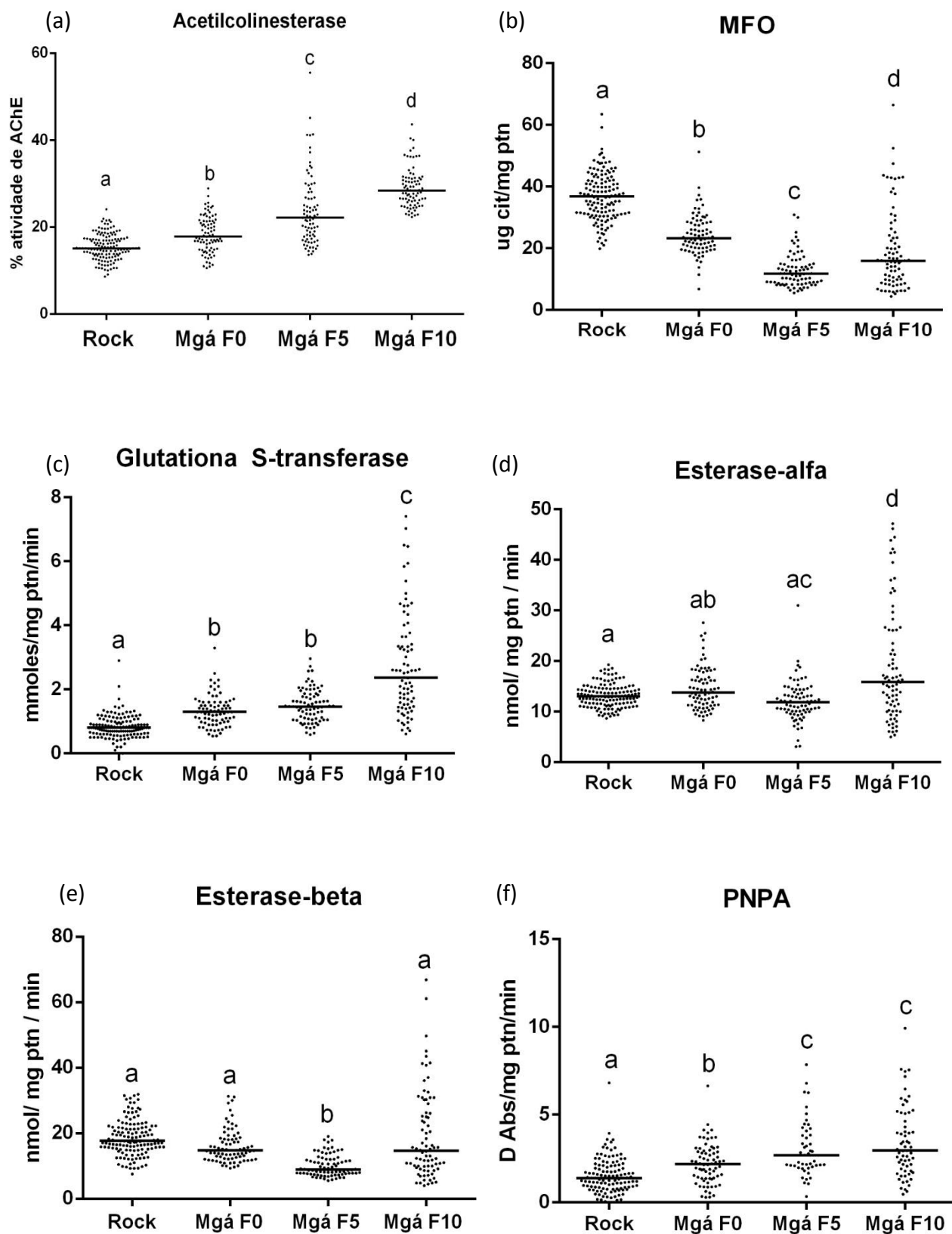


Figura 12. Perfil de atividade enzimática e mediana de acetilcolinesterase (a), oxidase de função mista (b), glutathione S-transferase (c), esterase α (d), esterase β (e) e esterase PNPA (f) de fêmeas de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller (Rock) e das gerações F0, F5 e F10 da população de 2013 (Mgá F0, Mgá F5 e Mgá F10).

6 DISCUSSÃO

As populações de *A. aegypti* estão submetidas em ambiente natural à pressão de seleção de diversas classes de inseticidas. Esta prática constante seleciona populações resistentes a esses compostos (BESERRA et al., 2007; PERRY et al., 2011). A ausência dessa pressão, possivelmente, ocasiona a reversão da resistência.

Os indivíduos resistentes podem ter alterações de ordens genética, bioquímica, fisiológica, comportamental e morfológica e podem ser avaliadas através do uso de diversas ferramentas, como análises moleculares, ensaios enzimáticos, bioensaios de suscetibilidade e morfometria geométrica.

O aumento da resistência dos mosquitos aos inseticidas tem sido identificado em mais de 60 países, afetando todas as principais espécies de vetores e todas as classes de inseticidas (LIU, 2015).

De acordo com os bioensaios de suscetibilidade com temefós, o aumento da razão de resistência e a diminuição da mortalidade do ano 2012 para o ano 2013 e, conseqüentemente, a alteração do status de suscetibilidade de “alterado” para “resistente”, demonstram que as populações estudadas apresentam resistência ao temefós e indicam que a utilização deste inseticida pode não ser eficaz no controle da dengue e demais doenças cujos vetores são insetos, indicando processo de estabelecimento de resistência.

Os resultados mostram que deve ser avaliada a substituição do método químico utilizado para o combate do mosquito no município, pois segundo os critérios definidos em 2006 pela Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *A. aegypti* a inseticidas (MoReNAa), sugere-se a substituição do inseticida quando os bioensaios demonstram mortalidade inferior a 70% ou razão de resistência maior que três.

Existem diversos trabalhos verificando a suscetibilidade de *A. aegypti* ao temefós e os casos de resistência em diversas regiões do Brasil (PINHEIRO; TADEI, 2002; LIMA et al., 2003, 2006; MACORIS et al., 2003; CARVALHO et al., 2004; DUQUE-LUNA et al., 2004; BRAGA et al., 2004; PONTES et al., 2005; BESERRA et al., 2007; MONTELLA et al., 2007; ANDRIGHETTI et al., 2008; MELO-SANTOS et al., 2010; PROPHIRO et al., 2011; BONA et al., 2012;

MARCOMBE et al., 2012) e do mundo (WIRTH; GEORGHIOU, 1999; MAESTRE et al., 2009; OCAMPO et al., 2011; ZAVALA et al., 2014).

Em tese e dissertação não publicadas, Duque-Luna (2008) e Piccoli (2010) trabalharam com população de campo também do município de Maringá, coletadas respectivamente em 2005 e 2008. No primeiro, a mortalidade encontrada foi 81,5% com RR_{95} de 6,9 e na população de 2008 a mortalidade encontrada foi 61% e RR_{95} de 7,18. Esses diferentes padrões de resistência observados na mesma região durante o tempo podem estar associados ao histórico do uso do produto no município, com diferentes frequências de aplicações durante os anos, submetendo-os a diferentes pressões de seleção, assim como observado por Beserra et al. (2007).

Montella et al. (2007), em população de *A. aegypti* do Rio de Janeiro, encontrou RR maior em 2004 do que em 2002/2003, mesmo tendo sido interrompida a aplicação de temefós desde 2001. Os autores consideraram que o resultado provavelmente tenha sido devido à resistência cruzada com piretróides, introduzido em campo desde 2001, ou ao uso incontrolado de diferentes classes de inseticidas da população local.

Després et al. (2014) concluíram que uma alternativa à resistência cruzada é o uso dos inseticidas biológicos, pois os genes e vias metabólicas envolvidas na resposta adaptativa a produtos químicos são diferentes daqueles ligados a um inseticida biológico, considerando que a seleção de indivíduos resistentes tem menor probabilidade de ocorrer a ambos os inseticidas simultaneamente. Além disso, os pesquisadores observaram que o custo adaptativo foi maior em todas as fases da vida do mosquito quando resistentes ao inseticida biológico Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis*).

No estudo atual, o aumento da mortalidade nas gerações F5 e F10 e diminuição da razão de resistência, quando comparada com a geração F1, mostram que a ausência do contato com o inseticida temefós provocou a diminuição da resistência ao longo das gerações. No entanto, como o status de suscetibilidade manteve-se “resistente”, constatou-se a necessidade de mais de dez gerações para a eficaz reversão da suscetibilidade ao temefós.

Os estudos que mostram o acompanhamento da reversão da resistência em populações naturais de *A. aegypti* são escassos. Em uma população desta espécie no Caribe, a reversão da resistência, mediada apenas pela ausência

da pressão de seleção ao temefós, se deu em longo prazo, pois a razão de resistência caiu de 46,8 para 8,5 vezes, 10 anos após a primeira análise (WIRTH; GEORGHIOU, 1999).

Em uma pesquisa laboratorial, Paris et al. (2011) verificaram que em apenas cinco gerações sem pressão de seleção a população resistente alcançou o mesmo nível que a cepa susceptível.

Melo-Santos et al. (2010) em trabalho com população de *A. aegypti* de Araripina (PE) cessaram a exposição ao temefós e observaram diminuição de 5,5 vezes na razão de resistência em três gerações e de 14 vezes em nove gerações. Parte da amostra da população cuja exposição ao temefós foi cessada foi cruzada com 50% de indivíduos suscetíveis e teve a resistência totalmente revertida já na terceira geração. Os autores também observaram um possível efeito no custo adaptativo associado à resistência a este organofosforado, que pode influenciar na biologia do mosquito em campo.

A resistência *knockdown* ou *kdr* é a resistência aos inseticidas piretróides, cujo sítio-alvo é o canal de sódio voltagem-dependente do sistema nervoso (LIU et al., 2000; BRAGA; VALLE, 2007b). Os genes que conferem resistência são recessivos e expressos em homozigose. Este fato faz com que, sob forte pressão de seleção, os alelos da resistência sejam selecionados de maneira rápida, o que exerce forte influência na estrutura genética da população (DAVIES et al., 2008). No caso da resistência Kdr em *A. aegypti* a mutação mais comumente encontrada é a Val1016Ile, e o alelo 1016Ile é o que ocorre em maior quantidade nos organismos resistentes (MARTINS; LINS; et al., 2009).

O genótipo homozigoto recessivo (Ile/Ile) e o alelo 1016Ile, de maneira geral, foram os mais presentes nas amostras estudadas, tanto comparando somente as populações de campo de 2012 e 2013, quanto comparando as 10 gerações criadas à partir da população parental coletada em 2013.

A frequência genotípica de Ile/Ile e a frequência alélica 1016Ile aumentaram de um ano para outro, indicando maior quantidade de indivíduos resistentes no ano de 2013. Este resultado possivelmente foi obtido devido a constante utilização de piretróide no combate ao vetor da dengue nos anos anteriores à pesquisa e a maior seleção de indivíduos resistente com o passar dos anos de exposição.

Nos testes entre as gerações, pode-se verificar que houve a diminuição do nível de resistência quando cessada a exposição a inseticida, pois a frequência alélica de 1016lle diminuiu da geração F0 (75%) para F5 (47%), e desta até F10, mante-se constante.

Este resultado possivelmente foi obtido devido à constante utilização de piretróide no combate ao vetor da dengue nos anos anteriores à pesquisa, .

Foram realizados diversos trabalhos detectando a mutação Val1016lle em populações de *A. aegypti* no Brasil. Entre eles, podem-se destacar os trabalhos de Martins, Lima et. al (2009) que detectaram elevada frequência do genótipo homozigoto recessivo em Dourados (MT); Linss et al. (2014) que identificaram alta frequência de 1016lle em diversas cidades brasileiras entre os anos 2008 e 2012, como em Aracaju (SE), Boa Vista e Pacaraima (RR), Aparecida de Goiânia, Uruaçu, São Simão e Campos Belos (GO), Cachoeiro do Itapemirim e Vitória (ES), Campo Grande (MG), Foz do Iguaçu (PR), Itaperuna, São Gonçalo e Duque de Caxias (RJ); e Martins; Lins; et al. (2009), cujos registros foram em Natal (RN), Rio de Janeiro e Nova Iguaçu (RJ).

No mundo, destacam-se os trabalhos em que a mutação foi detectada em Myanmar (KAWADA et al., 2014), New Orleans (USA), Cuba, Venezuela, Nicarágua, Panamá e Costa Rica (SAAVEDRA-RODRÍGUEZ et al., 2007), Martinique (MARCOMBE et al., 2012), Ilhas Caimã (HARRIS et al., 2010), México (SAAVEDRA-RODRÍGUEZ et al., 2007; GARCÍA et al., 2009), Vietnã (KAWADA et al., 2009), Haiti (MCALLISTER et al., 2012), entre outros.

Foi observado no estudo de Strode et al. (2012) que quando ocorre reversão da resistência, ocorre também diminuição da expressão dos genes relacionados com a resistência. Os autores tiveram por objetivo identificar genes individuais associados à resistência e avaliar os perfis de expressão gênica, antes e após a reversão da resistência. Constataram que houve uma correlação positiva entre a diminuição da razão de resistência e a diminuição dos níveis de expressão dos genes.

Vários parâmetros da biologia do inseto podem ser afetados pela resistência a pesticidas, tais como o tempo de desenvolvimento, a longevidade dos adultos, o comportamento, a reprodução e o sistema imune (BERTICAT et al., 2002). Uma vez alterados, estes aspectos têm o potencial de influenciar

tanto a dinâmica da disseminação de resistência quanto a relação entre os vetores e os parasitas que eles transmitem (BELINATO et al., 2012).

Em populações naturais, o custo adaptativo pode variar de acordo com as condições ecológicas do ambiente, como a oferta de alimento limitada, a temperatura e a interação com outros organismos, como predação, parasitismo e competição (BOURGUET et al., 2004). Porém, segundo Paris et al. (2011), em um período de alguns meses, o nível de resistência pode se tornar reduzido ao nível da linhagem suscetível, independente do tipo de ambiente e mesmo que diferentes custos adaptativos sejam expressos e envolvidos na contra seleção de indivíduos resistentes.

Assim como em Labbé et al. (2007), novas mutações que diminuem o custo adaptativo podem aparecer e se acumular na população. A substituição do alelo resistente custoso por outro menos custoso pode ocorrer no mesmo ou em outro locus. Porém, no presente estudo, a probabilidade de novas mutações é limitada, devido à pequena quantidade de gerações e do tamanho efetivo da população.

Quando o uso de inseticidas é interrompido, os indivíduos resistentes tendem a ser menos competitivos em relação aos indivíduos suscetíveis, levando à diminuição da frequência de insetos resistentes ao longo do tempo (MELO-SANTOS et al., 2010).

Com relação aos resultados dos ensaios bioquímicos, as enzimas AChE, PNPA-EST, MFO e GST, quando comparado com a cepa suscetível Rockfeller, tiveram queda na atividade enzimática da geração parental de 2012 para a de 2013, e no decorrer da criação em laboratório, na ausência de pressão de seleção, houve o aumento da atividade chegando aos maiores resultados em F10. O status foi “muito alterado” para GST e AChE, “alterado” para PNPA-EST e no caso de MFO, mante-se como “não alterado”, ou seja, não houve quantificação do grupamento heme.

As atividades das enzimas α -EST e β -EST também reduziram na geração F0 de um ano para outro e na geração F5 continuaram baixas, aumentando em F10, não havendo alteração de status em α -EST e passando de “não alterado” para “alterado” em β -EST.

Em *A. aegypti*, a atividade da MFO está fortemente associada à resistência a piretróides (BARIAMI et al., 2012), e a atividade de

acetilcolinesterase está associada à resistência a organofosforados e carbamatos (VALLE; MONTELLA, 2006). A GST tem sido ligada à resistência para todas as principais classes de inseticidas, porém essa conclusão é feita por associação utilizando-se substratos modelos, já que geralmente a enzima individual de GST não é identificada (ENAYATI et al., 2005). As ESTs possuem maior importância na detoxificação de organofosforados, mas também estão envolvidas na resistência a carbamatos e a piretróides (HEMINGWAY; RANSON, 2000).

Os dados obtidos nas análises bioquímicas se opõem aos resultados dos ensaios biológicos e moleculares, nos quais os menores níveis de resistência foram observados nas gerações F5 e F10, assim como o esperado, já que a tendência é que haja a queda nos níveis de resistência quando a população é submetida a ausência de pressão de seleção.

A população de *A. aegypti* que serviu como a geração parental para fundar as colônias com a ausência da pressão de inseticidas, provavelmente já apresentava níveis de sensibilidade alterada ou resistência cruzada devido à exposição na natureza a diferentes compostos utilizados no controle químico. Wirth e Georgiou (1999) realizaram observação semelhante em trabalho com resistência a temefós.

Montella et al. (2007) em populações de *A. aegypti* de várias regiões do Brasil também encontraram redução na atividade das enzimas α -EST e β -EST de um ano para outro. Porém, neste caso, o resultado pode estar relacionado com a interrupção oficial do uso do temefós, iniciada em 2001. No entanto, o declínio na atividade das esterases foi mais lento do que o esperado neste período. Isso pode refletir uma pressão de seleção continuada do uso eficaz do temefós ou uma reação cruzada potencial com outros inseticidas administrados de forma incontrolável.

No mesmo estudo, Montella et al. (2007) verificaram que populações brasileiras de *A. aegypti* resistentes ao organofosforado temefós e ao piretróide cipermetrina apresentaram alterações nas atividades das enzimas GSTs. Houve um aumento da atividade da GST do ano de 2001 para 2002/2003. Em 2004, 90% dos indivíduos apresentaram percentual de atividade de GST menor que o p99 da cepa suscetível. Esses dados indicaram uma forte pressão de seleção, provavelmente consequência da decisão nacional de cessar o uso de

temefós e introduzir o uso do piretróide cipermetrina em 2001 para o controle dos adultos.

Em Strode et al. (2012), a análise bioquímica não mostrou nenhuma alteração significativamente diferente na atividade da enzima GST quando a geração parental e a F13 criada sem exposição a temefós foram comparados com a cepa Rockefeller, porém as atividades de todas enzimas (AChE, GST, MFO, α , β e PNPA-EST) foram menores na população sem contato com o temefós.

A técnica de morfometria geométrica das asas tem sido amplamente usada nos últimos anos para caracterizar diferenças morfológicas em Culicidae, tanto para caracterização do dimorfismo sexual, como para identificação de espécies e separação de populações (DUJARDIN, 2008; DHIVYA; MANIMEGALAI, 2013). Essas diferenciações podem ser influenciadas por algumas razões, em condições naturais e laboratoriais, como temperatura, disponibilidade de alimentos (JIRAKANJANAKIT et al., 2007; REISKIND; ZARRABI, 2012) e possivelmente pela resistência e sua reversibilidade, já que é comprovado que este fator afeta o fitness do inseto e aspectos da biologia (BOURGUET et al., 2004).

Cada população de *A. aegypti* representa um caso específico de estudo, visto que a reversão da resistência depende de fatores como as condições ambientais, os tipos de mutações envolvidas no fenótipo, a frequência e herança dos genes ligados à resistência, o histórico de aplicações de inseticidas e o nível preexistente de sensibilidade ao composto (HEMINGWAY et al., 2004).

Os resultados obtidos pelo eixo de variação que explica melhor as diferenças encontradas (CV1) agruparam as duas populações expostas aos inseticidas no eixo negativo, e as populações criadas em laboratório sob a ausência da pressão de inseticidas (F5 e F10) foram agrupados no eixo positivo. Não houve uma separação evidente entre os grupos, indicando a necessidade de maior período de tempo, ou seja, mais gerações, para que a reversão da resistência possa ser representada de forma mais clara através da análise de morfometria geométrica.

Guedes (2014), em sua tese não publicada, ao analisar os agrupamentos formados na CVA de acordo com o *status* de resistência a temefós, também

constatou a tendência das populações resistentes se localizarem em eixos negativos nos dois primeiros componentes principais.

Jirakanjanakit et al. (2008) analisaram o caráter herdável e poligênico do formato alar em *A. aegypti* mantidos em cativeiro por 10 gerações provenientes de um único par parental e detectaram tendência de aumento no tamanho das asas entre as gerações. Entre as linhagens de isofêmeas, as possíveis diferenças na forma das asas foram atribuídas mais às diferenças genéticas iniciais entre os pais e aos efeitos de isolamento depois de algumas gerações do que aos possíveis efeitos microambientais. Nesse caso, a morfometria geométrica pode ser um marcador genético em potencial para o estudo de população natural.

Em trabalho anterior de Jirakanjanakit e Dujardin (2005), com populações da mesma espécie criadas da 17ª à 564ª geração, foi constatado um decréscimo no tamanho das asas relacionado ao tempo de vida. A forma da asa da linhagem mais antiga foi a que teve maior diferenciação.

Ambos os trabalhos (JIRAKANJANAKIT; DUJARDIN, 2005; JIRAKANJANAKIT et al., 2008) concluíram que a disparidade métrica pode ser usada nas condições naturais para avaliar a complexidade relativa de locais de coleta e para monitorar linhagens de laboratório. Porém, não significa que a forma possa ser usada nas populações naturais para avaliar o nível de isolamento. As populações naturais não são geneticamente tão simples quanto as populações criadas em laboratório, pois muitos fatores, além de isolamento reprodutivo, são passíveis de afetar o desenvolvimento do inseto e consequentemente, sua forma.

Diversos trabalhos foram realizados indicando que o comprimento da asa representa um prognóstico do tamanho do corpo e da fecundidade em mosquitos, incluindo o gênero *Aedes* (PACKER; CORBET, 1989; BRIEGEL, 1990; BLACKMORE; LORD, 2000; ARMBRUSTER; HUTCHINSON, 2002; MORI et al., 2008; LEISNHAM et al., 2009; MCCANN et al., 2009).

No trabalho atual, as asas dos exemplares com maior resistência (Mgá F0 2012 e 2013) apresentaram-se ligeiramente mais largas e alongadas. De acordo com Strickman e Kittayapong (2003), fêmeas maiores geralmente têm asas maiores e pões mais ovos, e esta relação mostrou-se diretamente relacionada com as condições ambientais durante o desenvolvimento larval,

como a disponibilidade de alimentos e densidade larval. Em estudos para avaliar o custo da resistência aos inseticidas nos mosquitos, Bourguet et al. (2004) verificaram que o fenótipo resistente apresenta geralmente um comprimento da asa menor. Já em um estudo recente sobre populações de *A. aegypti* do México, o resultado foi oposto. As fêmeas que sobreviveram à exposição ao bioinseticida *spinosad* tiveram as asas ligeiramente mais longas e maior fecundidade, mas menor fertilidade do que as fêmeas não expostas (ANTONIO et al., 2009).

Mesmo que o número de gerações não tenha sido alto, é provável que haja o efeito da deriva genética sob as amostras, pois o isolamento simples pode gerar tais diferenças. Para Jirakanjanakit et al. (2008) a resposta para as diferenças na forma da asa é explicada principalmente pelos efeitos da deriva genética.

Trpis e Hausermann (1986) destacaram que, no ambiente natural, o isolamento físico é esperado para populações geográficas de *A. aegypti*, devido seu comportamento de dispersão ser relativamente baixo. As fêmeas voam geralmente de 100 a 500m, dependendo da disponibilidade de locais de oviposição e repasto.

E embora o tamanho de uma espécie de mosquito tenha a base genética, os fatores ambientais, como temperatura, nutrição, densidade larval e salinidade, também afetam o tamanho dos indivíduos (CLEMENTS, 1992). Porém, procurou-se reduzir ao máximo essas variáveis nas condições laboratoriais do presente trabalho, sendo esses fatores pouco prováveis para explicar a diferenciação nas asas. A hipótese de diferenciação geográfica é descartada nas amostras, já que as coletas foram realizadas no mesmo local e em condições climáticas e pluviométricas semelhantes, ainda que em anos diferentes. De um ano para outro, os indivíduos continuaram submetidos à pressão de inseticidas, resultando assim, em diferentes graus de suscetibilidade. Dessa forma, pode-se inferir que a resistência possa ser o fator que explique o poder de discriminação das asas.

A variação temporal de caracteres alares é um fato e deve ser levado em consideração quando as diagnoses de espécies são baseadas em caracteres alares, como usualmente é realizado na taxonomia de culicídeos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A população de *A. aegypti* de Maringá mantida em laboratório por dez gerações na ausência de contato com inseticidas apresentou reversão da suscetibilidade aos organofosforados e piretróides;
- Foi verificado aumento da razão de resistência e mudança do status da suscetibilidade ao organofosforado temefós de “alterado” para “resistente” nas populações de campo de *A. aegypti* dos anos 2012 e 2013. Após dez gerações mantidas sob condições de laboratório sem utilização de inseticidas, os bioensaios de suscetibilidade evidenciaram diminuição da razão de resistência e aumento na mortalidade dos indivíduos;
- Foi detectado aumento da frequência genotípica do homozigoto recessivo (Ile/Ile) e da frequência do alelo mutante (Ile), evidenciando maior a resistência a piretróide na população de 2013 comparando com a de 2012. No decorrer das gerações sem exposição a inseticidas, houve redução dos genes e alelos ligados à resistência da geração F0 para a F10;
- De 2012 para 2013, as enzimas AChE, α -EST e β -EST tiveram a atividade reduzida. Na avaliação da atividade de AChE, GST, β -EST e PNPA-EST entre as gerações, na F10 foi mais elevada em relação a Rock e F0. MFO foi a única enzima cuja atividade de F10 foi menor que da geração F0 e da cepa Rockefeller.
- Os dados obtidos pela análise dos componentes principais revelaram diferenças entre os indivíduos das populações estudadas. As principais modificações observadas foram relacionadas ao encurtamento ou extensão da região entre o meio e o ápice da asa. As asas das duas populações expostas aos inseticidas e com maior nível de resistência (F0 2012 e 2013) são ligeiramente mais largas e alongadas. Enquanto as asas das gerações F5 e F10, com menor resistência, são mais estreitas e encurtadas.
- Os melhores métodos para evidenciar a reversão da resistência foram os bioensaios de suscetibilidade e as análises moleculares de *kdr*.

REFERÊNCIAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Toxicological Profile for DDT, DDE, e DDD**. Atlanta, 2002. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=81&tid=20>>. Acesso em: 15/10/2014.

AHMED, M. A. I.; CORNEL, A. J.; HAMMOCK, B. D. Monitoring of Insecticide Resistance of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Colonies-Collected from California. **International Journal of Environmental Science and Development**, v. 3, n. 4, p. 346–349, 2012.

AMORIM, L. B.; HELVECIO, E.; OLIVEIRA, C. M. F. DE; AYRES, C. F. J. Susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) populations to the chemical insecticide temephos in Pernambuco, Brazil. **Pest Management Science**, v. 69, n. 12, p. 1307–1314, 2013.

ANDRIGHETTI, M. T. M.; CERONE, F.; RIGUETI, M.; GALVANI, K. C.; MACORIS, M. L. G. Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos. **Dengue Bulletin**, v. 32, p. 186–198, 2008.

ANTONIO, G. E.; SÁNCHEZ, D.; WILLIAMS, T.; MARINA, C. F. Paradoxical effects of sublethal exposure to the naturally derived insecticide spinosad in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Pest Management Science**, v. 65, n. 3, p. 323–326, 2009.

AQUINO-JUNIOR, J.; MENDONÇA, F. A problemática da dengue em Maringá-PR: uma abordagem socioambiental a partir da epidemia de 2007. **Hygeia**, v. 8, n. 15, p. 157–176, 2012.

ARMBRUSTER, P.; HUTCHINSON, R. A. Pupal Mass and Wing Length as Indicators of Fecundity in *Aedes albopictus* and *Aedes geniculatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 4, p. 699–704, 2002.

ASSIS, H. C. S. **Der Einsatz von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen**, 1998. PhD Thesis, Technische Universität Berlin, Alemanha.

BARIAMI, V.; JONES, C. M.; POUPARDIN, R.; VONTAS, J. G.; RANSON, H. Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. e1692, 2012.

BASS, C.; FIELD, L. M. Gene amplification and insecticide resistance. **Pest Management Science**, v. 67, n. 8, p. 886–890, 2011.

BECKEL, H. DOS S.; LORINI, I.; LAZZARI, S. M. N. Comportamento de adultos de diferentes raças de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera,

Bostrichidae) em superfície tratada com deltamethrin. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 48, n. 1, p. 115–118, 2004.

BELINATO, T. A.; MARTINS, A. J.; VALLE, D. Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p. 916–922, 2012.

BELKIN, J. N. **The Mosquitoes of the South Pacific: (Diptera, Culicidae)**. 1. ed. Berkeley: University of California Press, 1962.

BERGÉ, J.-B.; FEYEREISEN, R.; AMICHOT, M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 353, n. 1, p. 1701–1705, 1998.

BERTICAT, C.; BOQUIEN, G.; RAYMOND, M.; CHEVILLON, C. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. **Genetics Research**, v. 79, n. 1, p. 41–47, 2002.

BESERRA, E. B.; CASTRO-JUNIOR, F. P.; SANTOS, J. W.; SANTOS, T. S.; FERNANDES, C. Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 6, p. 853–860, 2006.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; QUEIROGA, M. F. C.; CASTRO-JUNIOR, F. P. Resistência de populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 2, p. 303–307, 2007.

BISSET, J. A.; RODRÍGUEZ, M. M. Resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de 2 provincias del Perú. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 59, n. 3, p. 202–208, 2007.

BLACKMORE, M. S.; LORD, C. C. The relationship between size and fecundity in *Aedes albopictus*. **Journal of Vector Ecology**, v. 25, n. 2, p. 212–217, 2000.

BONA, A. C. D.; PICCOLI, C. F.; LEANDRO, A. S.; et al. Genetic profile and molecular resistance of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae) in Foz do Iguaçu (Brazil), at the border with Argentina and Paraguay. **Zoologia**, v. 29, n. 6, p. 540–548, 2012.

BONILAU, P.; BELLINI, R.; CALZOLARI, M.; et al. Chikungunya Virus in *Aedes albopictus*, Italy. **Emerging Infectious Diseases journal**, v. 14, n. 5, p. 852–854, 2008.

BOURGUET, D.; GUILLEMAUD, T.; CHEVILLON, C.; RAYMOND, M. Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. **Evolution**, v. 58, n. 1, p. 128–135, 2004.

- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.
- BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; SOARES, S. D. S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 199–203, 2004.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, p. 113–118, 2007a.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007b.
- BRENGUES, C.; HAWKES, N. J.; CHANDRE, F.; et al. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 1, p. 87–94, 2003.
- BRIEGEL, H. Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. **Journal of Medical Entomology**, v. 27, n. 5, p. 839–850, 1990. Entomological Society of America.
- BRITO, L. P.; LINSS, J. G. B.; LIMA-CAMARA, T. N.; et al. Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e60878, 2013.
- BROGDON, W. G. Biochemical resistance detection: an alternative to bioassay. **Parasitology Today**, v. 5, n. 2, p. 56–60, 1989.
- BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. Insecticide resistance and vector control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 605–613, 1998.
- BROOKE, B. D.; KLOKE, G.; HUNT, R. H.; et al. Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 91, n. 4, p. 265–272, 2007.
- BUSVINE, J. R. Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. **Nature**, v. 168, n. 1, p. 193–195, 1951.
- CARDINI, A.; LOY, A. On growth and form in the “computer era”: from geometric to biological morphometrics. **Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy**, v. 24, n. 1, p. 1–5, 2013.
- CARRON, A. Correlation between wing measurements and dry body weight in male and female *Ochlerotatus (Ochlerotatus) caspius* (Pallas, 1771) (Diptera: Culicidae). **European Mosquito Bulletin**, v. 24, n. 1, p. 4–8, 2007.

- CARVALHO, M. D. S. L.; CALDAS, E. D.; DEGALLIER, N.; et al. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 5, p. 623–629, 2004.
- CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. **Pyrethrum flowers: production, chemistry, toxicology, and uses**. 1995.
- CASIMIRO, S. L. R.; HEMINGWAY, J.; SHARP, B. L.; COLEMAN, M. Monitoring the operational impact of insecticide usage for malaria control on *Anopheles funestus* from Mozambique. **Malaria Journal**, v. 6, n. 1, p. 142, 2007.
- CASTELHANO, F. J.; ROSEGHINI, W. F. F.; MENDONÇA, F. DE A. Clima urbano e dengue: uma introdução a partir da análise do campo térmico de Maringá/PR e Campo Grande/MS. **Revista Geonorte**, v. 2, n. 5, p. 735–748, 2012.
- CASTRO, M.; QUINTANA, N.; QUIÑONES, M. L. Evaluación de dos piretroides en el control del vector del dengue en Putumayo, Colombia. **Revista de Salud Pública**, v. 9, n. 1, p. 106–116, 2007.
- CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994.
- DAS, M.; DUTTA, P. Status of insecticide resistance and detoxifying enzyme activity of *Aedes albopictus* population in Sonitpur district of Assam, India. **International Journal of Mosquito Research**, v. 1, n. 4, p. 35–41, 2014.
- DAVIES, T. G. E.; FIELD, L. M.; USHERWOOD, P. N. R.; WILLIAMSON, M. S. A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. **Insect Molecular Biology**, v. 16, n. 3, p. 361–375, 2007.
- DAVIES, T. G. E.; REILLY, A. O. O.; FIELD, L. M.; WALLACE, B. A.; WILLIAMSON, M. S. Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: from target-site mutations to molecular modelling. **Pest Management Science**, v. 64, n. 1, p. 1126–1130, 2008.
- DE, A.; DE, A.; PUN, J. Impact of Global Climate Change on Human Health and Risk Prevention. **Crossing the Border: International Journal of Interdisciplinary Studies**, v. 2, n. 1, p. 127–134, 2014.
- DEMARI-SILVA, B.; SUESDEK, L.; SALLUM, M. A. M.; MARRELLI, M. T. Wing geometry of *Culex coronator* (Diptera: Culicidae) from South and Southeast Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 174–183, 2014. Parasites & Vectors.
- DEMIRCI, B.; LEE, Y.; LANZARO, G. C.; ALTEN, B. Altitudinal genetic and morphometric variation among populations of *Culex theileri* Theobald (Diptera: Culicidae) from northeastern Turkey. **Journal of Vector Ecology**, v. 37, n. 1, p. 197–209, 2012.

DESPRÉS, L.; STALINSKI, R.; FAUCON, F.; et al. Chemical and biological insecticides select distinct gene expression patterns in *Aedes aegypti* mosquito. **Biology Letters**, v. 10, n. 12, p. 6–11, 2014.

DEVICARI, M.; LOPES, A. R.; SUESDEK, L. Dimorfismo sexual alar em *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae). **Biota Neotropica**, v. 11, n. 2, p. 1–5, 2011.

DHIVYA, R.; MANIMEGALAI, K. Wing Shape Analysis of the *Japanese encephalitis* vector *Culex gelidus* (Diptera: Culicidae) at the Foot Hill of Southern Western Ghats, India. **World Journal of Zoology**, v. 8, n. 1, p. 119–125, 2013.

DIABATE, A.; BRENGUES, C.; BALDET, T.; et al. The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. **Tropical Medicine and International Health**, v. 9, n. 12, p. 1267–1273, 2004.

DICK, O. B.; SAN MARTÍN, J. L.; MONTOYA, R. H.; et al. The history of dengue outbreaks in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 584–593, 2012.

DJOUAKA, R.; IRVING, H.; TUKUR, Z.; WONDJI, C. S. Exploring mechanisms of multiple insecticide resistance in a population of the malaria vector *Anopheles funestus* in Benin. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e27760, 2011.

DOMINGUES, I.; AGRA, A. R.; MONAGHAN, K.; SOARES, A. M. V. M.; NOGUEIRA, A. J. A. Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 5–18, 2010.

DUJARDIN, J. P. Morphometrics applied to medical entomology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 6, p. 875–890, 2008.

DUQUE-LUNA, J. E.; MARTINS, M. F.; ANJOS, A. F.; KUWABARA, E. F.; NAVARRO-SILVA, M. A. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 6, p. 842–843, 2004.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 88–95, 1961.

ENAYATI, A. A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, v. 14, n. 1, p. 3–8, 2005.

ENAYATI, A. A.; VATANDOOST, H.; LADONNI, H.; TOWNSON, H.; HEMINGWAY, J. Molecular evidence for a kdr-like pyrethroid resistance mechanism in the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 1, p. 138–144, 2003.

FFRENCH-CONSTANT, R. H.; DABORN, P. J.; GOFF, G. LE. The genetics and genomics of insecticide resistance. **Trends in Genetics**, v. 20, n. 3, p. 163–170, 2004.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1952.

FONSECA-GONZÁLEZ, I.; QUIÑONES, M. L. Resistencia a insecticidas en mosquitos (Diptera: Culicidae): mecanismos, detección y vigilancia en salud pública. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 31, n. 2, p. 107–115, 2005.

FONSECA-GONZÁLEZ, I.; QUIÑONES, M. L.; LENHART, A.; BROGDON, W. G. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. **Pest management science**, v. 67, n. 4, p. 430–437, 2011.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. 1. ed. São Paulo: EDUSP, 1996.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. 2. ed. São Paulo: EDUSP, 2002.

FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. **Biomolecular engineering**, v. 23, n. 4, p. 149–169, 2006.

FULTON, M. H.; KEY, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 20, n. 1, p. 37–45, 2001.

GALLOWAY, T. S.; HANDY, R. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. **Ecotoxicology**, v. 12, n. 1-4, p. 345–363, 2003.

GARCÍA, G. P.; FLORES, A. E.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; et al. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in México. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 10, p. e531, 2009.

GOMES, A. D. C. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (stegomyia) albopictus* em Programa de Vigilância Entomológica. **Informe Epidemiológico do Sus (IESUS)**, v. 7, n. 3, p. 49–57, 1998.

GOMES, A. DOS S.; SCIAVICO, C. J. DE S.; EIRAS, Á. E. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 327–332, 2006.

GÓMEZ, G. F.; MÁRQUEZ, E. J.; GUTIÉRREZ, L. A.; CONN, J. E.; CORREA, M. M. Geometric morphometric analysis of Colombian *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) reveals significant effect of environmental factors on wing traits and presence of a metapopulation. **Acta Tropica**, v. 135, n. 1, p. 75–85, 2014. Elsevier B.V.

GOODALL, C. Procrustes Methods in the Statistical Analysis of Shape. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 53, n. 2, p. 285–339, 1991.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480–496, 1998.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The emergence of a global health problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 55–57, 1995.

HARBACH, R. E. Valid Species List. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/sites/mosquito-taxonomic-inventory.info/files/ValidSpeciesList_33.pdf>. Acesso em: 2/1/2015.

HARRIS, A. F.; RAJATILEKA, S.; RANSON, H. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 277–284, 2010.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 1009–15, 2000.

HEMINGWAY, J.; HAWKES, N. J.; MCCARROLL, L.; RANSON, H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 7, p. 653–65, 2004.

HEMINGWAY, J.; KARUNARATNE, S. H. P. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Medical and veterinary entomology**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 1998.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual review of entomology**, v. 45, n. 1, p. 371–391, 2000.

HENRY, A. B.; THONGSRIPONG, P.; FONSECA-GONZÁLEZ, I.; JARAMILLO-OCAMPO, N.; DUJARDIN, J. P. Wing shape of dengue vectors from around the world. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 2, p. 207–214, 2010.

HIMEIDAN, Y. E.; CHEN, H.; CHANDRE, F.; DONNELLY, M. J.; YAN, G. Short Report: Permethrin and DDT Resistance in the Malaria Vector *Anopheles arabiensis* from Eastern Sudan. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 6, p. 1066–1068, 2007.

JARAMILLO-OCAMPO, N.; FONSECA-GONZÁLEZ, I.; CHAVERRA-RODRÍGUEZ, D. Geometric morphometrics of nine field isolates of *Aedes aegypti* with different resistance levels to lambda-cyhalothrin and relative fitness of one artificially selected for resistance. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e96379, 2014.

JIRAKANJANAKIT, N.; DUJARDIN, J. P. Discrimination of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory lines based on wing geometry. **The Southeast**

Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, v. 36, n. 4, p. 858–861, 2005.

JIRAKANJANAKIT, N.; LEEMINGSAWAT, S.; DUJARDIN, J. P. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 4, p. 414–421, 2008.

JIRAKANJANAKIT, N.; LEEMINGSAWAT, S.; THONGRUNGKIAT, S.; et al. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n. 11, p. 1354–1360, 2007.

KANGA, L. H. B.; PREE, D. J.; LIER, J. L. VAN; WALKER, G. M. Management of insecticide resistance in Oriental fruit moth (*Grapholita molesta*; Lepidoptera: Tortricidae) populations from Ontario. **Pest Management Science**, v. 59, n. 8, p. 921–927, 2003.

KAWADA, H.; DIDA, G. O.; OHASHI, K.; et al. Multimodal pyrethroid resistance in malaria vectors, *Anopheles gambiae* s.s., *Anopheles arabiensis*, and *Anopheles funestus* s.s. in western Kenya. **PLoS one**, v. 6, n. 8, p. e22574, 2011.

KAWADA, H.; HIGA, Y.; KOMAGATA, O.; et al. Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 10, p. e527, 2009.

KAWADA, H.; OO, S. Z. M.; THAUNG, S.; et al. Co-occurrence of point mutations in the voltage-gated sodium channel of pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Myanmar. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e3032, 2014.

LABBÉ, P.; BERTHOMIEU, A.; BERTICAT, C.; et al. Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 4, p. 1056–1067, 2007.

LEISNHAM, P. T.; LOUNIBOS, L. P.; O'MEARA, G. F.; JULIANO, S. A. Interpopulation divergence in competitive interactions of the mosquito *Aedes albopictus*. **Ecology**, v. 90, n. 9, p. 2405–2413, 2009.

LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual review of entomology**, v. 52, p. 231–253, 2007.

LIMA, E. P.; OLIVEIRA FILHO, A. M.; OLIVEIRA LIMA, J. W.; et al. *Aedes aegypti* resistance to temefos in counties of Ceará State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 259–263, 2006.

LIMA, E. P.; PAIVA, M. H. S.; ARAÚJO, A. P.; et al. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 5–17, 2011. BioMed Central Ltd.

LIMA, J. B. P.; CUNHA, M. P.; SILVA-JUNIOR, R. C.; et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 3, p. 329–333, 2003.

LINSS, J. G. B.; BRITO, L. P.; GARCIA, G. A.; et al. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 25, p. 1–11, 2014.

LIU, N. Pyrethroid Resistance in Insects: Genes, Mechanisms, and Regulation. In: F. Perveen (Ed.); **Insecticides – Advances in Integrated Pest Management**. p.458–468, 2012.

LIU, N. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 537–559, 2015.

LIU, N.; LI, T.; REID, W. R.; YANG, T.; ZHANG, L. Multiple Cytochrome P450 genes: their constitutive overexpression and permethrin induction in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e23403, 2011.

LIU, Z.; VALLES, S. M.; DONG, K. Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 10, p. 991–997, 2000.

LORENZ, C.; MARQUES, T. C.; SALLUM, M. A. M.; SUESDEK, L. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 257, p. 1–7, 2012. Parasites & Vectors.

LOUNIBOS, L. P. Invasions by insect vectors of human disease. **Annual review of entomology**, v. 47, n. 1, p. 233–266, 2002.

LUMJUAN, N.; SEVERSON, D. W.; PRAPANTHADARA, L.; et al. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 10, p. 1026–1035, 2007.

MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; NALON, K. DE C. R.; GARBELOTO, V. C.; CALDAS JÚNIOR, A. L. Standardization of Bioassays for Monitoring Resistance to Insecticides in *Aedes aegypti*. **Dengue Bulletin**, v. 29, n. 1, p. 176–182, 2005.

MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; TAKAKU, L.; et al. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 703–708, 2003.

MAESTRE, R.; REY, G.; SALAS, J. DE LAS; et al. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) a temefos en Atlántico-Colombia. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 35, n. 2, p. 202–205, 2009.

MAESTRE-SERRANO, R.; GOMEZ-CAMARGO, D.; PONCE-GARCIA, G.; FLORES, A. E. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the Colombian Caribbean Region. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 116, n. 1, p. 63–73, 2014. Elsevier Inc.

MARCOMBE, S.; MATHIEU, R. B.; POCQUET, N.; et al. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e30989, 2012.

MARTINEZ-TORRES, D.; CHANDRE, F.; WILLIAMSON, M. S.; et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s. s. **Insect Molecular Biology**, v. 7, n. 2, p. 179–184, 1998.

MARTINEZ-TORRES, D.; CHEVILLON, C.; BERGÉ, J.-B.; PASTEUR, N.; PAURON, D. Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. **Pesticide Science**, v. 55, n. 1, p. 1012–1020, 1999.

MARTINS, A. J.; BRITO, L. P.; LINSS, J. G. B.; et al. Evidence for gene duplication in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti*. **Evolution, Medicine, and Public Health**, v. 1, n. 1, p. 148–160, 2013.

MARTINS, A. J.; LIMA, J. B. P.; PEIXOTO, A. A.; VALLE, D. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. **Tropical Medicine and International Health**, v. 14, n. 11, p. 1351–1355, 2009.

MARTINS, A. J.; LINS, R. M. M. A.; LINSS, J. G. B.; PEIXOTO, A. A.; VALLE, D. Voltage-Gated Sodium Channel Polymorphism and Metabolic Resistance in Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* from Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 1, p. 108–115, 2009.

MATOWO, J.; JONES, C. M.; KABULA, B.; et al. Genetic basis of pyrethroid resistance in a population of *Anopheles arabiensis*, the primary malaria vector in Lower Moshi, north-eastern Tanzania. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 274, p. 1–9, 2014.

MAXWELL, D. M.; KOPLOVITZ, I.; WOREK, F.; SWEENEY, R. E. A structure-activity analysis of the variation in oxime efficacy against nerve agents. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 231, n. 2, p. 157–64, 2008.

- MCALLISTER, J. C.; GODSEY, M. S.; SCOTT, M. L. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Port-au-Prince, Haiti. **Journal of Vector Ecology**, v. 37, n. 2, p. 325–332, 2012.
- MCCANN, S.; DAY, J. F.; ALLAN, S.; LORD, C. C. Age modifies the effect of body size on fecundity in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 34, n. 2, p. 174–181, 2009.
- MÉLO, M. E. B. DE; MERLO, K. C.; FERNANDES, R. R. DE C.; et al. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 3, p. 196–201, 2008.
- MELO-SANTOS, M. A. V.; VARJAL-MELO, J. J. M.; ARAÚJO, A. P.; et al. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta Tropica**, v. 113, n. 2, p. 180–189, 2010.
- MENDONÇA, F. Aquecimento global e saúde: uma perspectiva geográfica – notas introdutórias. **Terra Livre**, v. 1, n. 20, p. 205–221, 2003.
- MENDONÇA, F. DE A.; DANNI-OLIVEIRA, I. M. **Climatologia - Noções Básicas e Climas do Brasil**. 1. ed. São Paulo: Oficina de Textos, 2007.
- MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. **Princípios de Morfometria Geométrica**. Holos Editora, 1999.
- MONTELLA, I. R.; MARTINS, A. J.; VIANA-MEDEIROS, P. F.; et al. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 3, p. 467–477, 2007.
- MONTELLA, I. R.; MARTINS, A. J.; VIANA-MEDEIROS, P. F.; et al. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 437–449, 2012.
- MORAIS, S. A.; MORATORE, C.; SUESDEK, L.; MARRELLI, M. T. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 5, p. 672–676, 2010.
- MORGAN, J. C.; IRVING, H.; OKEDI, L. M.; STEVEN, A.; WONDJI, C. S. Pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population from Uganda. **PloS one**, v. 5, n. 7, p. e11872, 2010.
- MORI, A.; ROMERO-SEVERSON, J.; BLACK IV, W. C.; SEVERSON, D. W. Quantitative trait loci determining autogeny and body size in the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*). **Heredity**, v. 101, n. 1, p. 75–82, 2008.

MOTOKI, M. T.; SUESDEK, L.; BERGO, E. S.; SALLUM, M. A. M. Wing geometry of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in five major Brazilian ecoregions. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 6, p. 1246–1252, 2012. Elsevier B.V.

NAUEN, R. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. **Pest Management Science**, v. 63, n. 1, p. 628–633, 2007.

NKYA, T. E.; AKHOUAYRI, I.; POUPARDIN, R.; et al. Insecticide resistance mechanisms associated with different environments in the malaria vector *Anopheles gambiae*: a case study in Tanzania. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 28–43, 2014.

NORMILE, D. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. **Science**, v. 342, n. 1, p. 415, 2013.

OCAMPO, C. B.; SALAZAR-TERREROS, M. J.; MINA, N. J.; MCALLISTER, J.; BROGDON, W. G. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. **Acta Tropica**, v. 118, n. 1, p. 37–44, 2011. Elsevier B.V.

OKOYE, P. N.; BROOKE, B. D.; KOEKEMOER, L. L.; HUNT, R. H.; COETZEE, M. Characterisation of DDT, pyrethroid and carbamate resistance in *Anopheles funestus* from Obuasi, Ghana. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 6, p. 591–598, 2008.

PACKER, M. J.; CORBET, P. S. Size variation and reproductive success of female *Aedes punctator* (Diptera: Culicidae). **Ecological Entomology**, v. 14, n. 3, p. 297–309, 1989.

PARIS, M.; DAVID, J.-P.; DESPRÉS, L. Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 6, p. 1184–1194, 2011.

PARREIRA, F. V.; PANIAGO, E. B.; CARVALHO, C. R.; AFONSO, R. J. D. C. F. Avaliação da presença de pesticidas N-metilcarbamatos e seus produtos de degradação nas águas da região de Pará de Minas (MG) Brasil. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 77–92, 2001.

PERIAGO, M. R.; GUZMÁN, M. G. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 21, n. 4, p. 187–191, 2007.

PERRY, T.; BATTERHAM, P.; DABORN, P. J. The biology of insecticidal activity and resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 411–422, 2011. Elsevier Ltd.

PINHEIRO, V. C. S.; TADEI, W. P. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 6, p. 1529–1536, 2002.

POLSON, K. A.; BROGDON, W. G.; RAWLINS, S. C.; CHADEE, D. D. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 117, n. 1, p. 31–38, 2011. Elsevier B.V.

PONTES, R. J. S.; REGAZZI, A. C. F.; LIMA, J. W. O.; KERR-PONTES, L. R. S. Efeito residual de apresentações comerciais dos larvicidas temefos e *Bacillus thuringiensis israelensis* sobre larvas de *Aedes aegypti* em recipientes com renovação de água. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 4, p. 316–321, 2005.

POUPARDIN, R.; REYNAUD, S.; STRODE, C.; et al. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 5, p. 540–551, 2008.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 11–17, 2013.

PRIETO, A. V.; SUAREZ, M. F.; OBANDO, R. G. Susceptibilidad de dos poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Cali (Valle, Colombia) a Temefos (Abate) y Triflumuron (Starycide). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 28, n. 2, p. 175–178, 2002.

PROPHIRO, J. S.; SILVA, O. S.; DUQUE-LUNA, J. E.; et al. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temefos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 1–6, 2011.

RAHARIMALALA, F. N.; RAVAOMANARIVO, L. H.; RAVELONANDRO, P.; et al. Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae), in Madagascar. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 56, p. 1–10, 2012. BioMed Central Ltd.

RAJATILEKA, S.; BURHANI, J.; RANSON, H. Mosquito age and susceptibility to insecticides. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 5, p. 247–253, 2011. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.

RANSON, H.; JENSEN, B.; VULULE, J. M.; et al. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. **Insect Molecular Biology**, v. 9, n. 5, p. 491–497, 2000.

REAL, R.; ROJAS, G.; CORREA, D.; et al. Manifestaciones sistémicas del dengue. **Revista del Nacional (Itauguá)**, v. 5, n. 2, p. 8–16, 2013.

REINERT, J. F.; HARBACH, R. E.; KITCHING, I. J. Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters

of all life stages. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 142, n. 3, p. 289–368, 2004.

REISKIND, M. H.; ZARRABI, A. A. Is bigger really bigger? Differential responses to temperature in measures of body size of the mosquito, *Aedes albopictus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 7, p. 911–917, 2012. Elsevier Ltd.

REITER, P.; FONTENILLE, D.; PAUPY, C. *Aedes albopictus* as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 8, p. 463–464, 2006.

RIBEIRO, A. F.; MARQUES, G. R. A. M.; VOLTOLINI, J. C.; CONDINO, M. L. F. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 4, p. 671–676, 2006.

RIVERON, J. M.; CHIUMIA, M.; MENZE, B. D.; et al. Rise of multiple insecticide resistance in *Anopheles funestus* in Malawi: a major concern for malaria vector control. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 344, 2015. BioMed Central.

RODRÍGUEZ, M. M.; HURTADO, D.; SEVERSON, D. W.; BISSET, J. A. Inheritance of Resistance to Deltamethrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 6, p. 1213–1219, 2014.

SAAVEDRA-RODRÍGUEZ, K.; URDANETA-MARQUEZ, L.; RAJATILEKA, S.; et al. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**, v. 16, n. 6, p. 785–798, 2007.

SAN MARTÍN, J. L.; BRATHWAITE, O.; ZAMBRANO, B.; et al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 128–135, 2010.

SANDE, S.; ZIMBA, M.; CHINWADA, P.; et al. The emergence of insecticide resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) from sentinel sites in Mutare and Mutasa Districts, Zimbabwe. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 466, 2015. BioMed Central.

SANTOLAMAZZA, F.; CALZETTA, M.; ETANG, J.; et al. Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa. **Malaria Journal**, v. 7, n. 1, p. 74–82, 2008.

SARKAR, M.; BHATTACHARYYA, I. K.; BORKOTOKI, A.; et al. Insecticide resistance and detoxifying enzyme activity in the principal bancroftian filariasis vector, *Culex quinquefasciatus*, in northeastern India. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 23, n. 2, p. 122–131, 2009.

SCOTT, J. G. Cytochromes P450 and insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 9, p. 757–777, 1999.

SENDAYDIEGO, J. P.; GOROSPE, J. M.; TORRES, M. A. J.; AMPARADO JR., R. F.; DEMAYO, C. G. Describing wing shape among *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) detected positive and negative for filaria using relative warp analysis. **Journal of Medical and Bioengineering**, v. 3, n. 1, p. 50–54, 2014.

SENDAYDIEGO, J. P.; TORRES, M. A. J.; DEMAYO, C. G. Describing wing geometry of *Aedes aegypti* using landmark-based geometric morphometrics. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 3, n. 4, p. 379–383, 2013.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M.; DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, v. 360, n. 1, p. 1–16, 2001.

SILVA-JUNIOR, J. B. DA; SIQUEIRA, J. B.; COELHO, G. E.; VILARINHOS, P. T. R.; PIMENTA, F. G. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. **Epidemiological Bulletin**, v. 23, n. 1, p. 3–6, 2002.

SLICE, D. E.; BOOKSTEIN, F. L.; MARCUS, L. F.; ROHLF, F. J. APPENDIX I - A Glossary for Geometric Morphometrics. Disponível em: <<http://life.bio.sunysb.edu/morph/glossary/gloss1.html>>. Acesso em: 15/9/2014.

STENHOUSE, S. A.; PLERNSUB, S.; YANOLA, J.; et al. Detection of the V1016G mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by allele-specific PCR assay, and its distribution and effect on deltamethrin resistance in Thailand. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 253, p. 1–10, 2013. Parasites & Vectors.

STRICKMAN, D.; KITTAYAPONG, P. Dengue and its vectors in Thailand: calculated transmission risk from total pupal counts of *Aedes aegypti* and association of wing-length measurements with aspects of the larval habitat. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 2, p. 209–217, 2003.

STRODE, C.; MELO-SANTOS, M. A. V.; MAGALHÃES, T.; ARAÚJO, A. P.; AYRES, C. F. J. Expression profile of genes during resistance reversal in a temephos selected strain of the dengue vector, *Aedes aegypti*. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e39439, 2012.

TAHIR, H. M.; HUSSAIN, K.; KHAN, A. A.; et al. Susceptibility of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to malathion in Sargodha district, Pakistan. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 3, n. 4, p. 1–4, 2013.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle da febre amarela no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 3, p. 555–558, 2010.

TEIXEIRA, M. DA G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe Epidemiológico do Sus (IESUS)**, v. 8, n. 4, p. 5–33, 1999.

THOMAS, S. J. Preventing Dengue - Is the Possibility Now a Reality? **The New England Journal of Medicine**, p. 1–2, 2014.

TRPIS, M.; HAUSERMANNT, W. Dispersal and other population parameters of *Aedes aegypti* in an african village and their possible significance in epidemiology of vector-borne diseases. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 6, p. 1263–1279, 1986.

VALLE, D.; MONTELLA, I. R. Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. **Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 1, p. 128, 2006.

VALOTTO, C. F. B.; CAVASIN, M. G.; SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pelo tanino catéquico isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* (Sapindaceae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 4, p. 309–321, 2010.

VAREJÃO, J. B. M.; SANTOS, C. B.; REZENDE, H. R.; BEVILACQUA, L. C.; FALQUETO, A. Criadouros de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na cidade de Vitória, ES. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 238–240, 2005.

VARGAS, R. E. M.; PHUMALA-MORALES, N.; TSUNODA, T.; APIWATHNASORN, C.; DUJARDIN, J. P. The phenetic structure of *Aedes albopictus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, n. 1, p. 242–251, 2013. Elsevier B.V.

VASCONCELOS, P. F. DA C. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 6, p. 1144–1149, 2010.

VASCONCELOS, P. F. DA C.; SPERB, A. F.; MONTEIRO, H. A. O.; et al. Isolations of yellow fever virus from *Haemagogus leucocelaenus* in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, p. 60–62, 2003.

VAZEILLE, M.; MOUSSON, L.; FAILLOUX, A.-B. Failure to demonstrate experimental vertical transmission of the epidemic strain of Chikungunya virus in *Aedes albopictus* from La Réunion Island, Indian Ocean. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 632–635, 2009.

VIDAL, P. O.; CARVALHO, E.; SUESDEK, L. Temporal variation of wing geometry in *Aedes albopictus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1030–1034, 2012.

VIDAL, P. O.; PERUZIN, M. C. J.; SUESDEK, L. Wing diagnostic characters for *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, n. 1, p. 134–137, 2011.

VIDAL, P. O.; SUESDEK, L. Comparison of wing geometry data and genetic data for assessing the population structure of *Aedes aegypti*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 3, p. 591–596, 2012. Elsevier B.V.

VILLAR, L.; DAYAN, G. H.; ARREDONDO-GARCÍA, J. L.; et al. Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. **The New England Journal of Medicine**, p. 1–11, 2014.

WAN-NORAFIKAH, O.; NAZNI, W. A.; LEE, H. L.; ZAINOL-ARIFFIN, P.; SOFIAN-AZIRUN, M. Permethrin resistance in *Aedes aegypti* (Linnaeus) collected from Kuala Lumpur, Malaysia. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 13, n. 3, p. 175–182, 2010.

WAN-NORAFIKAH, O.; NAZNI, W. A.; LEE, H. L.; ZAINOL-ARIFFIN, P.; SOFIAN-AZIRUN, M. Development of permethrin resistance in *Culex quinquefasciatus* Say in Kuala Lumpur, Malaysia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 3, p. 241–250, 2013. King Saud University.

WIRTH, M. C.; GEORGHIOU, G. P. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 15, n. 3, p. 315–20, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Instruction for determining the susceptibility or resistance in adult mosquitoes to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides - Diagnostic Test**. Geneva, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Comprehensive Guidelines for Prevention and Control of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever**. New Delhi, India, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors**. Geneva, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes**. Geneva, 2013.

YANOLA, J.; SOMBOON, P.; WALTON, C.; NACHAIWIENG, W.; PRAPANTHADARA, L. A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, n. 3, p. 127–131, 2010. Elsevier Inc.

YU, F. H.; CATTERALL, W. A. Overview of the voltage-gated sodium channel family. **Genome Biology**, v. 4, n. 3, p. 1–7, 2003.

ZAMBRANO, P. (ED.). **Protocolo de Vigilancia em Salud Publica: Malaria.** Instituto Nacional de Salud, 2014.

ZAVALA, M. DEL C. T.; COTO, C. M. M. R.; LEYVA, Y. R.; BISSET, J. A.
Evaluación de temefos y pyriproxifeno en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Guayaquil, Ecuador. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 66, n. 1, p. 71–83, 2014.